

Die Identifizierung ektodermaler Signalwege während der frühen Augenentwicklung im Huhn

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biologe Jörg Martin Steinfeld

aus Gross-Gerau

1. Referent: Prof. Dr. Paul G. Layer

2. Referent/Referentin: Prof. Dr. Ulrike Nuber

Tag der Einreichung: 12. Januar 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 04. März 2016

Darmstadt 2016

Inhalt

Zusammenfassung	9
Abkürzungen	10
1. Einleitung.....	15
1.1. Das Modellsystem Huhn.....	15
1.2. Die Entwicklung des Vertebratenauges.....	16
1.3. Das retinale Pigmentepithel (RPE)	17
1.4. Signale aus dem Augenumfeld gliedern den Augenvesikel in eine Netzhaut und RPE-Domäne	21
1.4.1. Das proximo-distale Modell der frühen Augenentwicklung	22
1.4.2. Molekulare Mechanismen der frühen Augentwicklung	23
1.5. FGFs aus dem Oberflächenektoderm induzieren die Netzhautentwicklung	36
1.6. TGF- β -Familienmitglieder aus dem Mesenchym induzieren die frühe RPE-Domäne.	37
1.7. WNT-Signale besitzen eine potenzielle Funktion während der RPE-Entwicklung.	39
1.8. Zielsetzung	40
2. Material und Methoden	41
2.1. Material	41
2.1.1. Chemikalien.....	41
2.1.2. Zusammensetzung chemischer Lösungen	43
2.1.3. Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die <i>in situ</i> Hybridisierung	44
2.1.4. Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die	45
2.1.5. Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die HE Färbung	46
2.1.6. Zusammensetzung von Medien für die Organkultur.....	46
2.1.7. Primäre Antikörper	46
2.1.8. Sekundäre Antikörper.....	47
2.1.9. „beads“	47
2.1.10. Proteine und Chemikalien für die „bead“-Applikation	48

2.1.11. Geräte	48
2.1.12. Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	50
2.2. Methoden	51
2.2.1. Vorbereitung der Embryonen.....	51
2.2.2. Die Herstellung von Präparationsbestecken	53
2.2.3. Die Herstellung von Wolfram-Mikronadeln und Glasnadeln	53
2.2.4. Die Herstellung von feinen Messern	55
2.2.5. Entfernung des Oberflächenektoderms vom Augenvesikel	55
2.2.6. „bead“-Applikation	56
2.2.7. Elektroporation.....	58
2.2.8. Herstellung von Augenvesikelexplantaten (Organkultur)	59
2.2.9. Die Anfertigung histologischer Gefrierschnitte	62
2.2.10. Paraffinschnitte.....	63
2.2.11. Sondensynthese für die <i>in situ</i> Hybridisierung	64
2.2.12. <i>In situ</i> Hybridisierung	67
2.2.13. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung	71
2.2.14. Immunhistochemie	71
2.2.15. Agarose-Gelelektrophorese.....	73
3. Ergebnisse.....	74
3.1. Die frühe Spezifizierung der RPE-Domäne vollzieht sich unterhalb des BMP-exprimierenden Oberflächenektoderms.....	75
3.2. Phosphorylierte SMAD-Proteine, die eine Funktion während dem aktiven BMP-Signalweg besitzen, sind zum Zeitpunkt der RPE-Spezifizierung im Augenvesikel lokalisiert.....	76
3.3 Das Oberflächenektoderm besitzt eine essenzielle Funktion bei der frühen Augenentwicklung	77
3.4. Die Entfernung des Oberflächenektoderms führt im Augenvesikel zum Verlust der MITF und pSMAD-Proteine	78
3.5. BMPs können MITF und pSMAD-Proteine im Augenvesikel in Folge der Oberflächenektoderm-Entfernung stabilisieren.....	79

3.6. Die Mitglieder der WNT-Familie besitzen eine essenzielle Funktion während der RPE-Spezifizierung und der Verschiebung der RPE-Domäne in die dorsale Region des Augenvesikels...	82
3.7. Während der frühen Augenentwicklung ist eine nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion von Bedeutung.....	84
3.8. In Folge der Oberflächenektodermentfernung reichen WNT-Signale aus, um die RPE-Spezifizierung und Bildung des Augenbechers aufrecht zu erhalten	85
3.9. Die Hemmung der GSK3- β reicht aus, um die RPE-Domäne in Folge der Oberflächenektodermentfernung aufrecht zu erhalten.	87
3.10. Die Hemmung der WNT-Liganden führt zum Verlust der MITF-Lokalisation.....	92
3.11. Nicht der kanonische, sondern der nicht-kanonische WNT-Signalweg besitzt eine Funktion während der Spezifizierung der RPE-Domäne im frühen Augenvesikel.....	94
3.12. Die alleinige Hemmung von <i>Wnt2b</i> führt nicht zum Verlust der MITF- Proteinlokalisierung....	96
3.13. Histologische Studien nach WNT- und AP-Behandlung.....	97
3.14. Die Hemmung der GSK3- β führt zu einer MITF-Lokalisation unabhängig von nukleärer β -Catenin Translokation.....	106
3.15. <i>In vitro</i> Studien zum Funktionsverlust der GSK3- β durch die Applikation von Alsterpaullone (Bestätigung der <i>in vivo</i> Ergebnisse).....	107
3.16. BMP-Signale sind essenziell für die MITF-Lokalisation während der RPE-Spezifizierung	109
3.17. BMPs können auch in späteren Entwicklungsstadien RPE induzieren	111
3.18. Die Funktion von BMPs und WNTs in späteren Stadien der Augenentwicklung.....	112
4. Diskussion:	119
4.1. Das Oberflächenektoderm induziert die RPE-Entwicklung im Huhn.....	119
4.2. BMPs aus dem Oberflächenektoderm sind essenziell für die RPE Entwicklung.....	120
4.3 Der WNT-Signalweg spielt ebenfalls eine Rolle bei der RPE-Spezifizierung	121
4.4. Ein nicht-kanonischer WNT-Signalweg scheint bei der RPE-Spezifizierung im	122
4.5. Der WNT- und der BMP-Signalweg kooperieren bei der RPE-Spezifizierung im	123
4.6. Während späterer Entwicklungsstadien führt die BMP-Applikation zur Bildung	126
4.7. Fazit.....	128
Literatur	129

Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Auges.....	20
Abbildung 2: Die frühe Augenentwicklung im Huhn	22
Abbildung 3: Das R-SMAD Monomer	25
Abbildung 4: Phosphorylierung und Funktion der BMP-SMAD1/5/8 Proteine.....	26
Abbildung 5: BMP-Signalweg und SMAD-Aktivierung.....	28
Abbildung 6: Der kanonische WNT-Signalweg	30
Abbildung 7: Der nicht-kanonische WNT-Signalweg	33
Abbildung 8: Inhibitoren des WNT-Signalwegs	34
Abbildung 9: Embryonale Strukturen während der Entwicklung des Hühnerembryos.	52
Abbildung 10: Die Herstellung von Wolfram-Mikronadeln.....	54
Abbildung 12: Vorbereitung der „bead“-Applikation.....	57
Abbildung 13: Elektroporation	59
Abbildung 14: Organkultur mittels Kultur-Einsatz.....	61
Abbildung 15: Dorso-ventrale Orientierung im Gefrierschnitt.....	63
Abbildung 16: Der Nachweis von mRNA durch <i>in situ</i> Hybridisierung	68
Abbildung 17: Die frühe MITF-Lokalisation im Hühnerembryo gegen Stadium HH9/10.	75
Abbildung 18: Die pSMAD1/5/8-Lokalisation verschiebt sich während der Entwicklung des Augenvesikels im Neuroepithel und Oberflächenektoderm von distal nach dorsal.....	76
Abbildung 19: Das Oberflächenektoderm im Huhn wird für die Entwicklung des Augenbechers und der Linse benötigt.....	77
Abbildung 20: Das <i>Bmp</i> -exprimierende Oberflächenektoderm scheint die MITF-Lokalisation im Augenvesikel zu regulieren.....	78
Abbildung 21: BMP7 erhält die MITF-Lokalisation nach Entfernung des Oberflächenektoderms im distalen optischen Vesikel aufrecht.....	80
Abbildung 22: In Abwesenheit des Oberflächenektoderms kann BMP7 die MITF-Lokalisation und die Augenbecherbildung aufrecht erhalten.	81
Abbildung 23: Die <i>Wnt2b</i> -Expression im dorsalen Neuroektoderm und Oberflächenektoderm während der frühen Augenentwicklung im Huhn.	83
Abbildung 24: Der WNT/ β -Catenin Signalweg ist im Neuroepithel des frühen Augenvesikels nicht aktiv.	84
Abbildung 25: WNT3a kann die Funktion des Oberflächenektoderms ersetzen und die MITF-Lokalisation aufrecht erhalten.....	86
Abbildung 26: WNT3a kann die Funktion des Oberflächenektoderms ersetzen und die Augenbecherbildung aufrecht erhalten.	87

Abbildung 27: AP erhält die MITF-Lokalisation im dorsalen Augenvesikel nach Entfernung des Oberflächenektoderms nur schwach aufrecht. In Gegenwart des Oberflächenektoderms führt AP zu einer hoch regulierten MITF-Lokalisation.....	88
Abbildung 28: Die Lokalisation von MITF und β -Catenin wird durch DMSO nicht beeinflusst.	90
Abbildung 29: Weder PBS noch mesenchymale Zellen beeinflussen die Phosphorylierung von SMAD in Folge der Entfernung des Oberflächenektoderms.	91
Abbildung 30: Für die Spezifizierung des RPEs ist das WNT-Signal von Bedeutung.....	92
Abbildung 31: Für die Spezifizierung des RPEs ist das kanonische WNT-Signal nicht von Bedeutung.	94
Abbildung 32: Die Hemmung von <i>Wnt2b</i> im Oberflächenektoderm wirkt sich nicht auf die MITF-Lokalisation im Augenvesikel aus.	96
Abbildung 33: WNT3a führt zur Hyperpigmentierung des optischen Vesikels und unterdrückt die Bildung des Augenbechers.....	98
Abbildung 34: Die Alsterpaullone vermittelte GSK3- β -Hemmung induziert RPE im distalen Augenvesikel.....	100
Abbildung 35: Die Hemmung der GSK3- β führt im Huhn zur Pigmentierung des Augenstiels und der prospektiven Retina.....	102
Abbildung 36: Die GSK3- β -Hemmung im Augenvesikel induziert die MITF-Lokalisation in der prospektiven Retina und im Augenstiel.....	104
Abbildung 37: Die GSK3- β -Hemmung im Augenvesikel führt im gesamten behandelten Auge zu einer drastischen Reduktion von <i>Vsx2</i> -Transkripten.	105
Abbildung 38: Die GSK3- β Hemmung im Augenvesikel führt nicht zur Akkumulation von nukleärem β -Catenin.	106
Abbildung 39: Die Hemmung der GSK3- β <i>in vitro</i> bewirkt die Bildung eines kleineren Augenbechers.	108
Abbildung 40: Die Hemmung der GSK3- β <i>in vitro</i> führt zur Hyperpigmentierung.....	109
Abbildung 41: Der aktivierte BMP-Signalweg ist essenziell für die MITF-Lokalisation während der anfänglichen RPE-Spezifizierung.....	110
Abbildung 42: BMP-Signale reichen aus, um in späteren Stadien RPE in differenzierenden Zellen der zentralen NR zu induzieren.....	112
Abbildung 43: In frühen Augenbecherstadien führt BMP5 zur Ablösung der NR vom RPE, zur Verjüngung der NR und zum Verlust der <i>Vsx2</i> -Expression.....	113
Abbildung 44: Im Vergleich zu β -Catenin scheint <i>Wnt2b</i> eine Funktion während der Respezifizierung der NR in Richtung RPE zu besitzen.	114

Abbildung 45: Die Behandlung des frühen Augenbechers mit BMP5 führt zur Hyperpigmentierung der CM.....	116
Abbildung 46: In frühen Augenbecherstadien führt BMP5 zur Ablösung der NR vom RPE, und zur Transdifferenzierung des RPEs in NR.....	117
Abbildung 48: Modell der dorsoventralen Musterbildung des Augenvesikels unter Einbeziehung der sich auf Stufe der SMAD-Phosphorylierung überscheidenden BMP-, WNT- und FGF- Signalwege....	125
Abbildung 49: BMPs scheinen in Abhängigkeit von Ort und Konzentration das Zellschicksal im frühen Augenbecher zu beeinflussen.....	127

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Paul G. Layer dafür bedanken, dass ich diese Arbeit an der Technischen Universität Darmstadt unter seiner Betreuung in seinem Labor anfertigen durfte. Ich danke Herrn Professor Dr. Paul G. Layer für sein Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Astrid Vogel-Höpker, welche die Idee zum Thema dieser Arbeit hatte und die mich betreute. Die unerschütterliche Zuversicht von Frau Dr. Astrid Vogel-Höpker in die Zukunft und in die Wissenschaft hat die erfolgreiche Arbeit erst möglich gemacht.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. Masasuke Araki, der es mir ermöglichte in seinem Labor in Japan die Techniken der Mikromanipulation zu erlernen. Das besondere Arbeitsklima in Japan hat mir erstmals gezeigt, dass Wissenschaft durchaus ein Vergnügen sein kann, bei dem man die Zeit gänzlich vergisst. Kaum eine Zeit hat mich während meines Studiums so geprägt wie die Zeit in Professor Masasuke Arakis Labor.

Frau Professor Dr. Ulrike Nuber danke ich ausdrücklich für ihr Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Referats.

Ich danke den technischen Assistenten Meike Stotz-Reimers, Jutta Smidek-Huhn und Michaela Becker-Röck für die stete Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Besonders danke ich an dieser Stelle Frau Ulrike Hoppe, die mir von Anfang an bis heute in der AG eine große Hilfe gewesen ist. Ich danke Herrn Wolfgang Schäfer, der in mir die Faszination für das Imkern entfacht hat.

Frau Dr. Gesine Bachmann, Herrn Dr. Florian Frohns, Frau Dr. Anja Heselich, Frau Anke König und Frau Johanna Kramer danke ich für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit.

Ein außerordentlicher Gewinn dieser Promotionsarbeit ist für mich überdies hinaus die enge Freundschaft zu meinen Kollegen Herrn Dr. Gopenath Thangaraj und Herrn Nicola Coronato. Ich bedanke mich an dieser Stelle für die Unterstützung und enge Zusammenarbeit.

Ich danke Meggi-Lee Hampel für die gute Zusammenarbeit.

Meinen engen Freunden Heidi und Karl-Heinz Köhler danke ich für die Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Freunden Monika und Dieter Blautzik danke ich für die Unterstützung in schwierigen Situationen.

Ich danke den Studenten Tamara Migge, Jascha Moussa und Alexander Bausch, die während ihres Studiums so viel Interesse an der Augenentwicklung gehabt haben, dass sie sich zum Teil zahlreiche Nächte mit mir während ihrer Praktika und Arbeiten im Labor um die Ohren geschlagen haben. Es gibt nichts besseres, als wenn Begeisterung ansteckt und gegenseitig beflügelt.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie. Meine Mutter ist die Person, die immer an mich glaubte und die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht hat. Neben meiner Mutter danke ich meiner Frau und ihrem grenzenlosen Vertrauen in mich. Ich danke meiner Frau für die letzten Jahre und die Bewältigung größter Probleme während denen die Nerven oft blank lagen. Ich danke beiden für ihre Geduld.

Ich danke meiner Großmutter Anna und meinem Vater.

Zusammenfassung

Während der frühen Musterbildung der Vertebraten bilden sich aus dem Neuroepithel des Augenvesikels die Domänen des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der neuralen Retina (NR). Das klassische Entwicklungsmodell des Wirbeltierauges beschreibt, wie Signale aus dem extraokularen Mesenchym das Zellschicksal in Richtung einer RPE-Entwicklung im proximalen Bereich des optischen Vesikels lenken, während Signale aus dem über dem Augenvesikel liegenden Ektoderm die Domäne der NR induzieren. Im Huhn wird der RPE-spezifische Transkriptionsfaktor *Mitf* erstmals direkt unterhalb des Oberflächenektoderms im distalen Augenvesikel induziert. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass nicht Signale aus dem Mesenchym, sondern aus dem Oberflächenektoderm während der anfänglichen Spezifizierung des RPEs von Bedeutung sind. Um diese Hypothese zu bestätigen, habe ich in dieser Studie embryologische Manipulationen am Hühnerembryo mit molekularen Techniken kombiniert. Ich zeige, dass das Oberflächenektoderm essentiell während der anfänglichen Spezifizierung von Zellen im Augenvesikel ist. Im Vesikelstadium der Augenanlagen konnten Mitglieder der BMP- und WNT-Familie im Oberflächenektoderm nachgewiesen werden. Die Expression dieser Faktoren im Oberflächenektoderm über dem Augenvesikel weist darauf hin, dass diese eine essenzielle Funktion während der anfänglichen RPE-Spezifizierung ausüben. Durch die Kombination von „gain-“ und „loss-of-function“-Studien konnte ich in dieser Studie zeigen, dass BMPs und WNTs miteinander kooperieren, um über einen GSK3- β -abhängigen, jedoch β -Catenin-unabhängigen Signalweg RPE im Neuroepithelium des Augenvesikels zu induzieren. Gemeinsam mit den derzeitigen Fortschritten in der Stammzellbiologie könnten diese Daten dazu beitragen, in vitro funktionale Augengewebe zu generieren und somit bei der Heilung von Augenerkrankungen mitzuwirken.

Abkürzungen

%	Prozent
°C	°C
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ALK	Aktivin-ähnliche Rezeptorkinase
AP	Alsterpaullone
APC	adenomatosis polyposis coli
AMD	altersbedingte Mauladegeneration
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
CamKII	Calmodulinabhängige Proteinkinase II
CM	„ciliary margin“
CK1α	Casein Kinase 1α
CO ₂	Kohlendioxid
cWnt13	Wnt2b (vormals „chick Wnt13“)

DAPI	4,6-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DKK	Dickkopf (Protein)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleicacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DSH	Dishevelled-Protein
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
evt.	eventuell
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Hydrochloric acid (Salzsäure)

HE	Hematoxylin und Eosin
HH	Hamburger und Hamilton
H ₂ O	Wasser
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
JNK	Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bretani bacterial growing medium VII
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
MAP	mitogen activated Protein
Min	Minute
msek	Millisekunde
<i>Mitf</i>	microphthalmia associated transcription factor (DNA/RNA)
MITF	microphthalmia associated transcription factor (Protein)
ml	Milliliter
Mmp115	Matrix-Metalloprotease 115
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nile blue A sulfat (Nil Blau)

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NR	neurale Retina (Netzhaut)
OD	optische Dichte; Absorption
OE	Oberflächenektoderm
p	phosphoryliert
PKC	Proteinkinase C
PAS	peripheral anionic site
<i>Pax</i>	paired box gene
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPE	retinales Pigmentepithel
R-SMAD	rezeptor reguliertes SMAD
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
sFRP	-secreted frizzled-related protein-1
SMAD	homologes Protein zum Drosophila Protein "mothers against decapentaplegic" (MAD)
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA Puffer

<i>Tbx5</i>	T-box transcription factor 5
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TGF- β	transforming growth factor β
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
Vis	visible light (sichtbares Licht)
<i>Vsx2</i>	<i>visual system homeobox gene2</i>
VSX2	visual system homeobox gene2
WHO	world health organization (Weltgesundheitsorganisation)
WIF1	wnt inhibiting factor-1
<i>Wnt</i>	wingless-type family member (DNA/RNA)
WNT	wingless-type family member (Protein)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Das Modellsystem Huhn

Das Huhn (*Gallus Gallus domesticus*) ist ein etablierter und gut beschriebener Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie. Die Grundlagenforschung am Huhn hat maßgeblich zum Erkennen komplexer Zell-Zell- und Gewebeinteraktionen beigetragen, welche für das Verständnis von menschlichen Erkrankungen von großer Bedeutung sind (Davey and Tickle 2007). Ende der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts förderte die Herstellung von Huhn/Wachtel Chimären das Wissen um Prozesse in der Zellmigration (Le Douarin 2005). Die Tatsache, dass Vögel derzeit die einzigen Organismen außerhalb der Ordnung der Säugetiere sind, von denen stabile embryonale Stammzelllinien hergestellt werden können, macht das Huhn nicht nur zu einem bedeutenden Modellorganismus für die klassische Entwicklungsbiologie, sondern auch für die Stammzellforschung (Intarapat and Stern 2013). Kürzlich angestellte Studien haben gezeigt, dass die Stammzeleigenschaften von Maus und Huhn ähnlich zu sein scheinen (Intarapat and Stern 2013), so dass sogar Säugetier/Huhn und Mensch/Huhn-Chimären realisierbar sind (Kharazi, Levy et al. 2013). Für die Forschung im Bereich der frühen Augenentwicklung stellt der Hühnerembryo wegen seiner bereits sehr früh entwickelten und sehr großen Augen einen hervorragenden Modellorganismus dar. Zu den Vorteilen des Hühnerembryos gehört die kommerziell leichte Verfügbarkeit von befruchteten Eiern, wie die Anzucht der Embryonen unter geeigneten Bedingungen im Inkubator. Durch die Hagelschnüre ist der Hühnerembryo immer im Ei nach oben auf dem Dotter liegend positioniert. Dies macht den Hühnerembryo zu jedem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung leicht zugänglich (Hamburger and Hamilton 1992). Manipulationen am Hühnerembryo können daher sowohl zeitlich, als auch örtlich präzise in bestimmten Geweben während der frühen Augenentwicklung durchgeführt werden. Das Huhn als etablierter Modellorganismus ermöglicht durch seine einfache Zugänglichkeit genetische Manipulationen wie zum Beispiel die Hemmung und Überexpression spezifischer Gene. Somit bietet das Huhn ideale Voraussetzungen, um als Modellsystem für die Erforschung der frühen Domänenspezifizierung (RPE/NR) während der Augenentwicklung herangezogen zu werden. Im Vergleich zu anderen Modellorganismen, wie zum Beispiel der

nachtaktiven Maus (Baker 2013), welche keine Makula besitzt, besitzt das Huhn eine ausgeprägte Makula (Grimm and Willmann 2012).

1.2. Die Entwicklung des Vertebratenauges

Die Bildung des Vertebratenauges ist ein Prozess, der komplexen zellulären und molekularen Mechanismen unterliegt. Noch bevor eine morphologische Struktur der frühen Vertebratenaugen sichtbar ist, beginnt auf molekularer Ebene die Bildung eines Augenfeldes im Bereich der anterioren Neuralplatte. Durch extrazelluläre Signale separiert sich das Augenfeld von den anderen Regionen des Gehirns (Fuhrmann, Zou et al. 2014), so dass es zu symmetrischen bilateralen Ausstülpungen aus dem Prosencephalon kommt. Diese bilateralen Ausstülpungen bilden das optische Primordium, das erste morphologisch zu erkennende Gewebe während der frühen Augenentwicklung (Chow and Lang 2001). Betrachtet man die Bildung des einzelnen Auges, so führt das fortschreitende laterale Auswachsen des optischen Primordiums zur Bildung des optischen Vesikels (Abb. 1). Nach dem klassischen Modell der frühen Augenentwicklung im Huhn ist das optische Vesikel anfänglich von Mesenchym umgeben und verlängert sich in distaler Richtung bis hin zum Oberflächenektoderm. Im distalen Bereich des optischen Vesikels erfolgt durch den Kontakt mit dem über dem optischen Vesikel liegenden Oberflächenektoderm die Spezifizierung der neuronalen Retina (Adler and Canto-Soler 2007). Während der fortschreitenden Embryonalentwicklung kann das optische Vesikel dann in die drei unterschiedlichen Domänen Augenstiel, retinales Pigmentepithel (RPE) und neuronale Retina (NR) unterteilt werden (Chow and Lang 2001). Die Bildung der Linse ist morphologisch erstmals durch eine Verdickung im distalen Oberflächenektoderm, der sogenannten Linsenplakode in der Nähe des nach distal ausgewachsenen optischen Vesikels zu erkennen (Ogino and Yasuda 2000). In höheren Vertebraten, wie zum Beispiel im Huhn, der Maus oder im Menschen, kommt es durch die Invagination der Linsenplakode zur Bildung einer Linsengrube. Zu diesem Zeitpunkt kann morphologisch erstmals die Einstülpung des distalen optischen Vesikels und damit die Bildung eines Augenbechers beobachtet werden. Die Linsenplakode und die sich aus der Linsenplakode bildende Linsengrube ist mit dem angrenzenden Oberflächenektoderm so lange verbunden, bis sich die Linsengrube während des Prozesses einer fortwährenden

Absenkung zum Linsenvesikel schließt und den Kontakt zum Oberflächenektoderm (der prospektiven Cornea oberhalb der Linse) verliert (Gunhaga 2011). Die sich während der Linsenbildung begleitend vollziehende Augenbecherbildung aus dem optischen Vesikel ist ein komplexer Vorgang. Mit der Invagination des optischen Vesikels zum Augenbecher kommt es zur Inversion des bereits spezifizierten, aber noch nicht differenzierten Augenepithels. Diese Inversion führt dazu, dass sich der Augenbecher in ein inneres und ein äußeres Blatt schichtet. Das pseudostratifizierte innere Gewebe bildet bei fortlaufender Entwicklung die vielschichtige ausdifferenzierte neuronale Retina, während das RPE ein einschichtiges Epithel im äußeren Bereich des Augenbechers bildet. Vor der Augenbecherbildung ist das RPE ein Zilien-tragendes pseudostratifiziertes Epithel, das erst mit der Bildung der Interphotorezeptormatrix und der Invagination des Augenbechers eine Differenzierung zum reiferen RPE vollzieht (Strauss 2005). Im ventralen Bereich verjüngt sich das optische Vesikel während der Augenbecherbildung und bildet auf diese Weise die optische Fissur, den späteren Sehnerv. Im Laufe der weiteren Augenentwicklung schließt sich die optische Fissur, in der die das Auge versorgenden Blutgefäße entlang ziehen (Bellaris and Osmond 1998) und durch welche die Axone der retinalen Ganglienzellen zum Gehirn projizieren (Adler and Canto-Soler 2007). Der periphere Bereich des Augenbechers bildet eine äußere Region, die „Ciliary Margin“ (CM). Die CM der Vertebraten besitzt undifferenzierte Vorläuferzellen, die während der Embryonalstadien fortwährend proliferieren und in der Peripherie neue Neurone und Gliazellen generieren (Kubo, Takeichi et al. 2003). Im späteren Verlauf der Entwicklung gehen aus der CM die nicht neuronalen epithelialen Strukturen der Iris und des Ciliarkörpers hervor (Chow and Lang 2001).

1.3. Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist von essenzieller Bedeutung für das Sehen. Aufgebaut ist das RPE aus einer einzelligen Schicht pigmentierter Zellen zwischen den äußeren Bereichen der lichtempfindlichen Photorezeptoren und den äußeren Bereichen der Gefäße der Choriocapillaris. Das RPE grenzt im Bereich der Choriocapillaris an die Bruchsmembran. Ein Teil der Blut/Retina Schranke wird durch das RPE gebildet. Das in das Auge einfallende und durch die Linse fokussierte Licht muss erst mehrere Schichten der neuronalen Retina

passieren, bis es auf die Schicht der lichtempfindlichen Photorezeptoren trifft (Abb. 1: A). Das RPE dient der neuronalen Retina (NR) als Licht absorbierender Schild und schützt die Photorezeptoren vor einer zu starken Lichtexposition. Die Zellen des einschichtigen RPEs besitzen apikal verlängerte Fortsätze (sogenannte Mikrovilli), mit denen sie die äußeren Segmente der Photorezeptoren schalenartig umkleiden (Bernstein 1961; Braekevelt 1990) und voneinander isolieren (Abb. 1: B, C). Seine Licht absorbierende Funktion erhält das RPE durch die basalen Pigmentgranula und die zahlreichen Melanosomen, die in die apikalen Bereiche des RPEs eingelagert sind. Bei Vögeln konnte gezeigt werden, dass sich die meisten Melanosomen einer RPE-Zelle während der Lichtadaptation in den apikalen Fortsätzen der RPE Zellen befinden. Die Melanosomen der apikalen Zellfortsätze sind kleiner als die Pigmentgranula auf der basalen Seite des RPEs und sind mit ihrer spindelförmigen Struktur parallel zur langen Achse der Zellfortsätze angeordnet (Braekevelt 1990). Neben den Melanosomen befinden sich auch angereicherte Pigmente wie Lipofuscin im RPE, die ebenfalls an der Lichtabsorption beteiligt sind. Insgesamt werden ca. 60% der Lichtenergie nur durch Melanosomen und Lipofuscin absorbiert (zusammengefasst in Strauss, 2005). Neben der Lichtabsorption besitzen die apikalen Fortsätze des RPEs eine Funktion bei der Vermittlung von Stoffen an die Rezeptorenaußenglieder und während der Phagozytose von geschädigten äußeren Segmenten (Hebel 1970; Braekevelt 1990; Strauss 2005). Gegenüber der apikalen Seite des RPEs hat die basale Seite des RPEs nahe der Choriocapillaris tiefe Einfaltungen. Diese Einfaltungen scheinen eine besondere Funktion bei der Aufnahme von Nährstoffen zu haben (Hebel 1970; Braekevelt 1990). Das RPE nimmt Nährstoffe wie Glucose, Retinol und Fettsäuren aus dem Blut auf und versorgt damit die Photorezeptoren der neuronalen Retina (NR) (Porter and Yamada 1960; Bernstein 1961; Strauss 2005). Außer der Lichtabsorption besitzt das RPE eine wichtige Funktion während des Sehzykluses. Zwischen dem RPE und den Photorezeptoren herrscht ein ständiger Austausch von Retinal. Eine besondere Bedeutung für den Sehzyklus besitzt das 11-*cis* Retinal, eine strukturelle Form des Retinals. Während der Photonenabsorption im Photorezeptor wird das 11-*cis* Retinal in all-*trans* Retinal umgeformt. Das 11-*cis* Retinal ist notwendig, um eine Erregbarkeit der Photorezeptoren durch Photonen aufrecht zu erhalten. Die Photorezeptoren der Retina sind jedoch nicht in der Lage, all-*trans* Retinal reversibel in 11-*cis* Retinal umzuformen. Das gebildete all-*trans* Retinal wird daher zum RPE transportiert und dort von all-*trans* Retinal in 11-*cis* Retinal reisolmerisiert. Der visuelle Retinalkreislauf schließt sich durch den

Rücktransport des in 11-*cis* Retinal umgewandelten all-*trans* Retinals (Strauss 2005). Das RPE sezerniert außerdem Wachstumsfaktoren, die von essenzieller Bedeutung für die angrenzenden Gewebe sind. Die unterschiedlichen beschriebenen Funktionen des RPEs machen deutlich, welche essenziellen Aufgaben das RPE während des visuellen Sehens erfüllt und welche biomedizinischen Potentiale im Verständnis um das RPE verborgen liegen. Eine selektive Schädigung des RPEs beeinträchtigt direkt die Funktion der Photorezeptoren und das neuronale Retinagewebe (Strauss 2005). Während frühe Defekte während der RPE Entwicklung zu Krankheitsbildern wie Microphthalmia führen, können späte Veränderungen im RPE eine trockene und feuchte Makuladegeneration bewirken. Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist derzeit die häufigste Ursache für Erblindungen in den westlichen Industrienationen.

Laut einer Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Mariotti, 2010; Mariotti and Pascolini, 2012) sind derzeit mehr als 239 Millionen Menschen sehbehindert und 45 Millionen von einer beidseitigen Erblindung der Augen betroffen (Whitcher, Srinivasan et al. 2001). Da die Makuladegeneration in den westlichen Industrienationen der häufigste Grund für eine Augenerkrankung mit anschließender Erblindung ist (Congdon, O'Colmain et al. 2004) und sich die Zahl der AMD Erkrankungen bis zum Jahr 2020 schätzungsweise nahezu verdoppelt haben wird (Friedman, O'Colmain et al. 2004), ist ein Zuwachs im Verständnis bezüglich der Entwicklung des Auges und der einzelnen Gewebe unbedingt notwendig. Die Grundlagenforschung bietet diverse Möglichkeiten, die Augenentwicklung und die Bildung von verschiedenen Augenerkrankungen an Modellorganismen zu untersuchen und so zur Entwicklung von biomedizinischen Anwendungen beizutragen. Durch Fortschritte in der Stammzellforschung könnten neben dem Einsatz einer direkten Zelltherapie auf diese Weise *in vitro* funktionale Gewebe gezüchtet werden, die zur Heilung sehgeschädigter Patienten beitragen. Aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit und der schon sehr früh sehr groß entwickelten Augen stellt das Huhn einen idealen Modellorganismus dar.

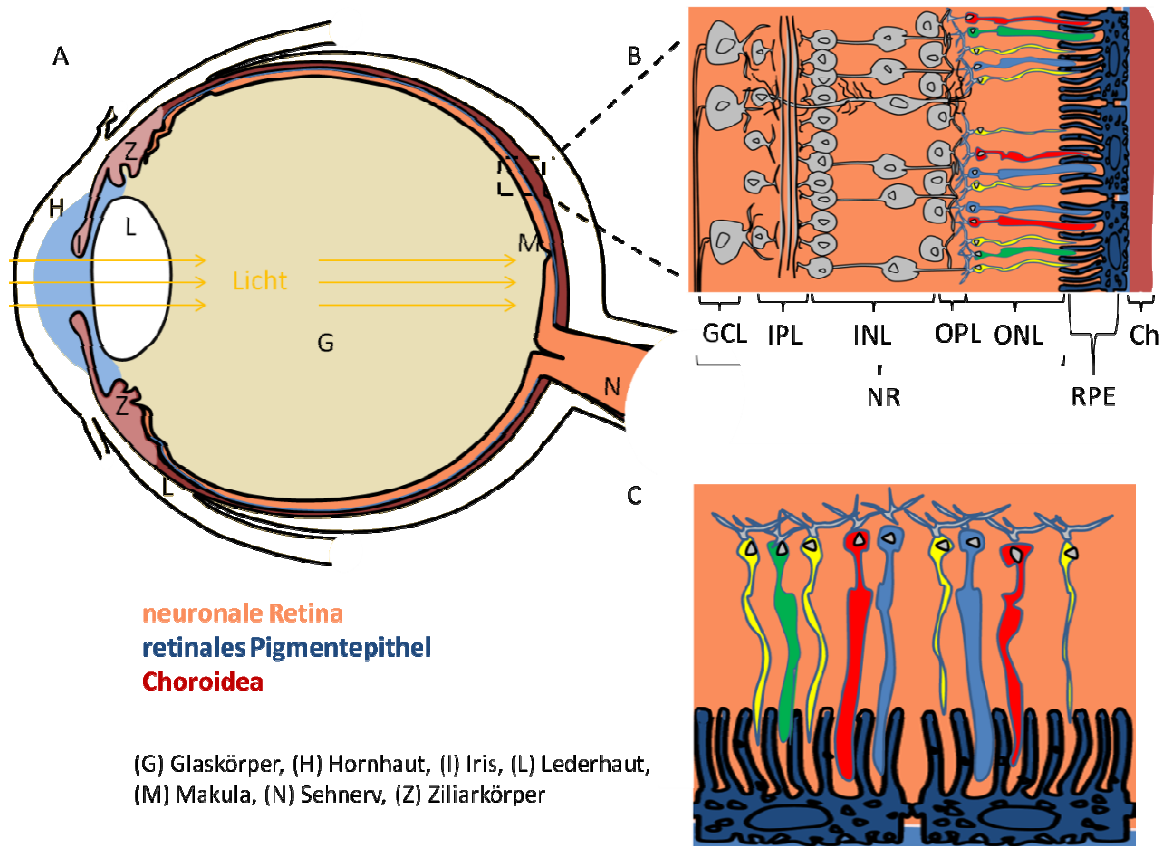


Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Auges

Das in das Vertebratenauge (A) einfallende Licht (gelbe Pfeile) passiert zuerst die Hornhaut (H), die Linse (L) und den Glaskörper (G), bevor es auf die neuronale Retina (NR, orange) auftrifft. Innerhalb der NR bildet die Makula (M) den Bereich mit der größten Dichte an Photorezeptoren (Zapfen) und bildet damit den Bereich der höchsten Sehschärfe. Die Lichtenergie wird in der NR in eine Erregung umgewandelt und diese gelangt über den Sehnerv (N) zum Gehirn. (B) Die NR ist ein vielschichtiges Gewebe, das zusammen mit dem retinalen Pigmentepithel (RPE, blau) eine funktionelle Einheit bildet. Das einschichtige RPE grenzt mit seiner basalen Seite an die Choroidea (dunkelrot). Das einfallende Licht passiert die Ganglienzellschicht (GCL), innere plexiforme und nukleäre Schicht (IPL, INL), sowie die äußere nukleäre und plexiforme Schicht (ONL, OPL) bevor das Licht dann auf die Photorezeptoren trifft. (C) In der vergrößerten Darstellung ist deutlich zu erkennen, dass die Photorezeptoren von den Mikrovilli des angrenzenden RPEs umgeben sind. Die Photorezeptoren können in die deutlich breiteren Zapfen (rot, grün, blau), die der Farbwahrnehmung dienen und in die etwas dünneren Stäbchen (gelb) die für die Wahrnehmung der Lichtintensität verantwortlich sind, unterschieden werden. Modifiziertes Schema nach Krstic und Wheeler, Burkitt und Daniels, 1987). Das Schema entspricht nicht dem tatsächlichen Maßstab.

1.4. Signale aus dem Augenumfeld gliedern den Augenvesikel in eine Netzhaut und RPE-Domäne

Bereits zu Anfang des letzten Jahrhunderts wiesen frühe, nicht auf molekulare Marker bezogene Studien darauf hin, dass Signale aus den an das optische Vesikel angrenzenden Geweben essenziell für die Augenentwicklung sind (Mikami 1939). Frühe Studien an Amphibien haben zum Beispiel gezeigt, dass sich Explantate optischer Vesikel nach Entfernung von Mesenchym und Ektoderm nicht weiter entwickeln, sondern im Vesikelstadium arretiert bleiben (Holtfreter 1939). Bereits 1935 zeigte Dragomirov anhand von Transplantationsstudien am frühen Augenbecher von Amphibien, dass das prospektive NR-Gewebe aus dem frühen Augenbecher dazu in der Lage ist weiterhin RPE zu bilden, wenn man dieses so transplantiert, dass es gänzlich von Mesenchym umgeben ist (Dragomirov, 1935). Durch Rotationsexperimente am frühen Augenbecher konnte gezeigt werden, dass auch das bereits zu RPE spezifizierte Gewebe die Fähigkeit besitzt eine zweite Retina bilden zu können, wenn man dieses mit Oberflächenektoderm in Kontakt bringt (Dragomirov, 1937; Detweiler, 1953). Dass Signale aus dem Ektoderm für die Netzhautentwicklung verantwortlich zu sein scheinen, konnte durch Manipulationen im Hühnerembryo bestätigt werden. Durch das Fehlen des Oberflächenektoderms entwickelte sich vor allem ein pigmentierter Vesikel, in dem nur wenige neuronale Zellen detektiert werden können (Hyer, Mima et al. 1998). Während Signale aus dem Oberflächenektoderm für die Netzhautentwicklung essenziell zu sein scheinen, deuten einige Studien darauf hin, dass Signale aus dem umliegenden Mesenchym für die RPE Entwicklung verantwortlich sind (Chow and Lang, 2001; Martinez-Morales et al., 2004; Fuhrmann, 2000). Während der frühen Phase der Augenentwicklung wandern Neuralleistenzellen aus der Region des Mittelhirns in den Bereich des Augenvesikels ein und bilden dort das den Augenbecher zukünftig umgebende Mesenchym (Kagiyama, Gotouda et al. 2005). Das Augenvesikel verschiedener Organismen scheint anfänglich von Mesenchym umgeben zu sein (Fuhrmann, Levine et al. 2000). In Urodelen und beim Menschen konnte jedoch gezeigt werden, dass der frühe optische Vesikel bereits zu seinen initialen Stadien in engem Kontakt zum Oberflächenektoderm steht (Lopashov and Stroevea, 1994). In die Kultur eingebrachtes Kopfmesenchym konnte die Wirkung des zuvor entfernten extraokularen Mesenchyms ersetzen. Eine Substitution mit lateralem Seitenplattenmesoderm konnte die Wirkung des

zuvor entfernten Mesenchyms nicht kompensieren (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass das Mesenchym eine essenzielle Funktion während der frühen Spezifizierung der RPE-Domäne besitzt.

1.4.1. Das proximo-distale Modell der frühen Augenentwicklung

Zusammenfassend kann man sagen, dass im klassischen Modell der frühen Augenentwicklung Signale aus dem distal gelegenen Oberflächenektoderm die Netzhautentwicklung im darunterliegenden Neuroepithel des Augenvesikels induzieren, während Signale aus dem proximal gelegenen Mesenchym die RPE Entwicklung initiieren (Fuhrmann, Levine et al. 2000; Chow and Lang 2001).

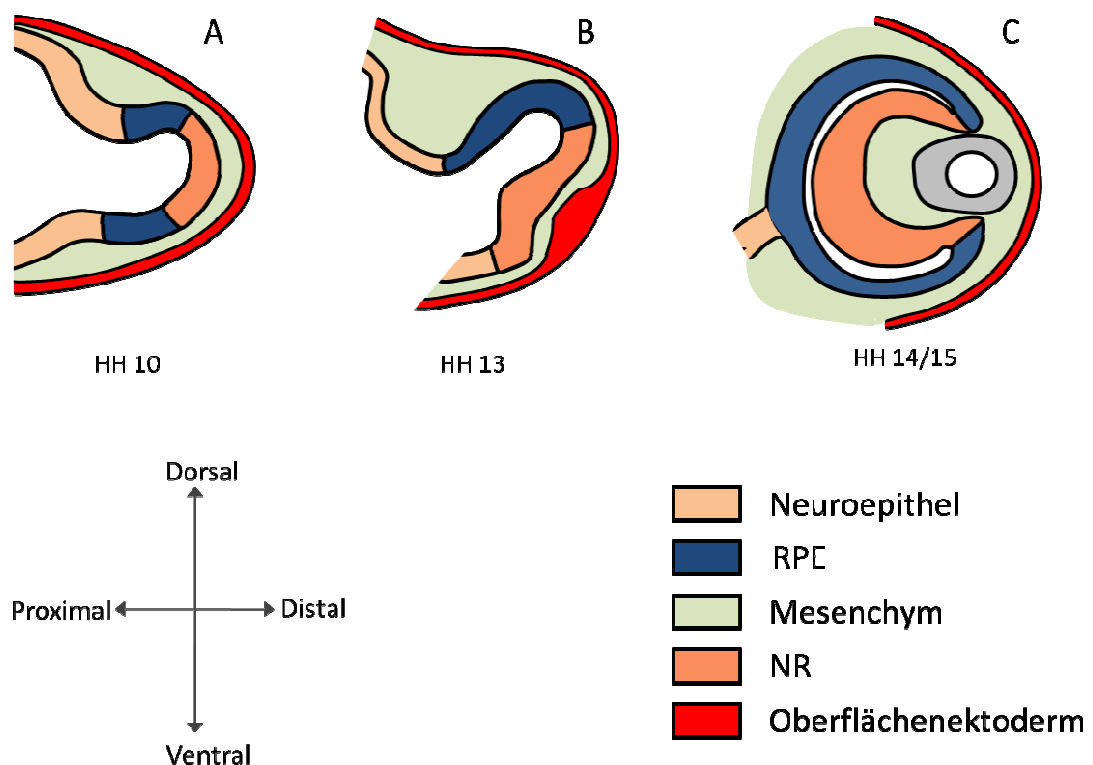


Abbildung 2: Die frühe Augenentwicklung im Huhn

Das Schema zeigt (A) das von Mesenchym (grün) umgebene, aus dem Prosencephalon in distaler Richtung auswachsende optische Vesikel im Stadium Hamburger und Hamilton (HH) 10. Bild B gibt das optische Vesikel im Stadium HH13 wieder, dessen Domänen sich bereits soweit spezifiziert haben, dass proximal die RPE-Domäne (blau) und distal die NR-Domäne (orange) zu erkennen sind. Bild D beschreibt den sich bildenden Augenbecher im Stadium HH14/15. Die im inneren Augenbecher liegende NR liegt zu diesem Zeitpunkt bereits dem im äußeren Augenbecher lokalisierten einschichtigen RPE an. Distal befindet sich die von der CM eingefasste Linse (grau).

1.4.2. Molekulare Mechanismen der frühen Augenentwicklung

1.4.2.1. Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs)

Die Fibroblastenwachstumsfaktoren gehören zu einer Familie parakriner Faktoren, die bei den Wirbeltieren 22 Mitglieder (bei den Säugetieren 18 Mitglieder) zählen (Beenken and Mohammadi 2009; Dorey and Amaya 2010). Die Mitglieder der FGF-Familie sind an Prozessen der Proliferation und Differenzierung beteiligt. FGFs werden in sieben Untergruppen bezüglich ihrer Sequenzhomologie eingeteilt. Die verschiedenen FGFs (z.B.: 1, 2 und 8) können an dieselben FGF-Rezeptoren, die zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gehören, binden. Die Bindung des FGF-Liganden an die RTK führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des FGF-Rezeptors. Über eine Kaskade von Proteinaktivierungen führt das FGF-Signal zur Aktivierung des RAS-G und RAF-Proteins. Das aktive RAF-Protein führt über die Protein-Kinase-C zur Phosphorylierung verschiedener Kinasen, wie zum Beispiel: MEK und ERK, welche Transkriptionsfaktoren im Zellkern phosphorylieren und so die Transkription der entsprechenden Zielgene regulieren. Die Ergebnisse früherer Studien weisen darauf hin, dass FGFs eine Funktion während der NR-Spezifizierung besitzen (de longh and McAvoy 1993; Pittack, Grunwald et al. 1997; Wilke, Gubbels et al. 1997; Hyer, Mima et al. 1998; Vogel-Höpker, Momose et al. 2000). Für FGF2 konnte gezeigt werden, dass dieses Signalprotein auch noch in Adultstadien eine Funktion während der Retinaregenertation besitzt (Layer et al. 2010).

1.4.2.2. Die Familie der TGF- β -Wachstumsfaktoren

Die „transforming growth factor β “ (TGF- β)-Familie besteht aus mehr als 30 strukturell ähnlichen Familienmitgliedern. Aufgrund der Vereinigung mehrerer Familien innerhalb der TGF- β -Familie wird diese auch als TGF- β -Superfamilie bezeichnet. Unter den Familienmitgliedern finden sich die Familien der Activine, „bone morphogenetic proteins“ (BMPs), GDNFs, TGF- β s, NODAL, und VG1.

1.4.2.3. Die Knochenmorphogenetische-Proteinfamilie (BMPs)

Die Mitglieder der BMP-Familie wurden ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit, die Knochenbildung zu induzieren, identifiziert. Heute ist bekannt, dass diese während der Knochenbildung aktiven knochenmorphogenetischen Proteine (engl. = bone morphogenetic proteins) eine Vielzahl von weiteren Funktionen während der Musterbildung besitzen. Die BMP-Proteine sind an Prozessen der Zellteilung, Apoptose, Zellmigration und Zelldifferenzierung beteiligt (Hogan 1996) und wirken während dieser Prozesse als Morphogene. Die BMPs der Vertebraten werden in zwei Untergruppen unterteilt (Celeste, Iannazzi et al. 1990). BMP5, BMP6 und BMP7 bilden wie BMP2 und BMP4 aufgrund ihrer strukturellen Homologien jeweils Vertreter einer gemeinsamen Subgruppe (Celeste, Iannazzi et al. 1990; Wozney, Rosen et al. 1990; Wozney 1992).

1.4.2.4. Die SMAD-Proteinfamilie

Die SMAD-Proteine wurden zum ersten Mal als Produkte der *Drosophila*-Mad und *C. elegans* Sma-Gene identifiziert (Whitman 1998; Patterson and Padgett 2000). Unterteilt werden die SMADs in drei Subfamilien. Eine Subfamilie bilden die R-SMAD-Proteine (R-Smads), die vom Typ-I-Rezeptor während der BMP-Signaltransduktion phosphoryliert werden (Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001). Zu den R-SMADs gehören die SMAD-Proteine 1, 2, 3, 5, und 8. SMAD4 bildet als weitere Gruppe unter den SMAD-Proteinen das Ko-Faktor-Protein, durch das die zuvor vom Typ-I-Rezeptor phosphorylierten SMAD-Proteine in den Zellkern geleitet werden, um dort in Kontakt mit den Transkriptionsfaktoren zu treten und die Genexpression zu regulieren. Die inhibitorischen SMADs (I-SMADs), zu denen SMAD6 und SMAD7 gehören, bilden eine weitere Subfamilie.

1.4.2.5. SMAD-Proteine: Aufbau und Funktion

Fast alle SMAD-Proteine besitzen zwei konservierte Domänen: (1) die konservierte Mad homologe 1 (MH1) Domäne und (2) die C terminale Mad homologe 2 (MH2) Domäne (Abb.

3). Die MH1-Domäne ist bei fast allen SMADs bis auf die I-SMADs ähnlich und hoch konserviert. Die MH1-Domäne ist die funktionelle Domäne, welche die SMAD-Translokation in den Zellkern und die Bindung an die Transkriptionsfaktoren vermittelt (Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001). Die MH2-Domäne bildet die Aktivierungsdomäne inaktiver R-SMADs. In der MH2-Domäne befinden sich C-terminale Serinreste, die während der Typ-I-vermittelten Aktivierung der R-SMADs phosphoryliert werden. Zwischen den Domänen MH1 und MH2 befindet sich die „Linker“-Region, die von Bedeutung für die Degradation der SMAD-Proteine ist. Nicht-phosphorylierte SMAD-Proteine kommen hauptsächlich als Monomere vor, die erst nach der Phosphorylierung durch den Rezeptor Typ-I Hetero-Oligomere mit Ko-SMAD4 bilden (Kawabata, Inoue et al. 1998).

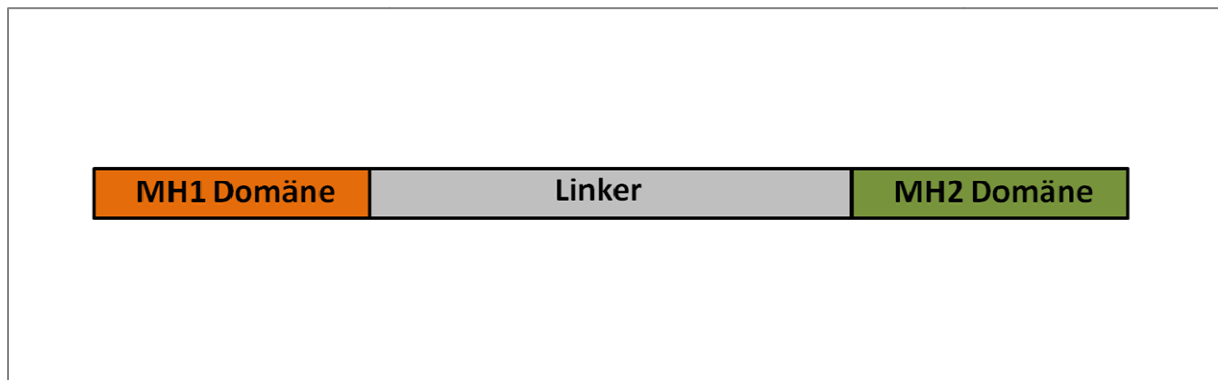


Abbildung 3: Das R-SMAD Monomer

Das Schema zeigt die für die Translokation der SMADs funktionelle MH1-Domäne (orange), die für die Aktivierung der R-SMADs funktionelle MH2-Domäne (grün) und die zwischen beiden Domänen liegende Linker-Region, die eine Funktion beim vermittelten SMAD-Abbau besitzt.

1.4.2.6. Phosphorylierung von SMAD-Proteinen

Die Intensität von BMP-Signalen wird durch die membranständigen Typ-I-Rezeptoren der TGF- β Signaltransduktion vermittelt, indem die Rezeptoren den Phosphorylierungszustand der SMAD-Proteine bestimmen. Die Phosphorylierung der SMADs bewirkt deren intrazelluläre Lokalisation und Funktion. Nur im Bereich der MH2-Domäne phosphorylierte (aktivierte) BMP1/5/8 SMAD-Proteine (pSMAD-Proteine) besitzen die Fähigkeit in den Zellkern zu translozieren. Inhibitorische SMADs bilden Komplexe mit R-SMADs und

markieren den Rezeptor für eine anschließende Degradation (Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001). Für SMAD4 konnte keine Phosphorylierung bei den Säugetieren nachgewiesen werden; daraus folgt, dass SMAD-Proteine nicht nur über eine Phosphorylierung aktiviert werden können. Ein Hinweis auf die komplexe Verknüpfung verschiedener Signalwege über die unterschiedlichen Stufen der SMAD Phosphorylierung (Abb. 4) könnte darin begründet sein, dass SMAD-Proteine nicht nur von Kinasen der TGF- β -Rezeptorfamilie, sondern auch von anderen Kinasen phosphoryliert werden (Hassel, Yakymovych et al. 2006; Eivers, Fuentealba et al. 2008). Kinasen, die SMADs phosphorylieren, sind neben den Rezeptorkinasen MAP Kinasen aus der ERK-Familie (Kretzschmar, Doody et al. 1999), die Ca²⁺ Calmodulinabhängige Proteinkinase II (CamKII) (Wicks, Lui et al. 2000), die Proteinkinase C (PKC) (Yakymovych, Ten Dijke et al. 2001), die GSK3- β (Fuentealba, Eivers et al. 2007; Eivers, Fuentealba et al. 2008), die MEKK-1 und die Jun N-terminale Kinase (JNK) (Brown, DiChiara et al. 1999).

Aufbau des inaktiven BMP-SMAD1/5/8



Aufbau des aktivierten BMP-SMAD1/5/8



Aufbau des diphosphorylierten SMAD-Proteins



Aufbau des triphosphorylierten SMAD-Proteins



Abbildung 4: Phosphorylierung und Funktion der BMP-SMAD1/5/8 Proteine

Das Schema zeigt (I) die funktionellen Domänen eines R-SMAD-Proteins am Beispiel des BMP-SMAD1/5/8, (II) die aktive Form des R-SMADs (pSMAD) nach Phosphorylierung der MH2-Domäne durch den Typ-I-Rezeptor, (III) das diphosphorylierte R-SMAD, welches nach der Aktivierung durch den Typ-I-Rezeptor eine zusätzliche Phosphorylierung in der Linker-Region erhalten hat, (IV) das triphosphorylierte R-SMAD, welches nach dem in III dargestellten Zustand eine zweite Phosphorylierung (z.B. durch die GSK3- β) in der Linker-Region erfahren hat.

1.4.2.7. Die BMP-Signaltransduktion

BMP-Proteine aktivieren spezifische BMP-Rezeptoren (BMPR), die zur Gruppe der transmembranen Serin/Threonin Kinase Rezeptoren gehören. BMP-Rezeptoren sind Mitglieder der TGF- β -Rezeptorfamilie und bilden heterodimere Komplexe aus zwei transmembranen Kinase-Rezeptoren des Typ-I-Rezeptors (BMPR-I) und des Typ-II-Rezeptors (BMPR-II) (Massague and Weis-Garcia 1996; Souchelnytskyi, ten Dijke et al. 1996). Der Typ-I-Rezeptor tritt als BMPR-IA und BMPR-IB Rezeptor auf. Beide Formen des Typ-I-Rezeptors sind Aktivin-ähnliche Rezeptorkinasen (ALK). Der BMPR-II Rezeptor lässt sich in drei verschiedenen Typen, BMPR-II, ACTR-II und ACTR-IIB unterteilen. Die an die Rezeptoren bindenden BMP-Liganden sind dimere Signalproteine. Zwischen den einzelnen Rezeptoren sind verschiedene Kombinationen möglich, an die mehrere Liganden binden können. BMP2 und BMP4 binden hauptsächlich an BMPR-IA und BMPR-IB. Die Mehrzahl der BMPs interagiert mit dem BMPR-II Rezeptor (Lodish et al. 2001). Der Typ-II-Rezeptor ist eine konstitutiv aktive Kinase, die in Abhängigkeit der Ligandenbindung eine Komplexbildung mit dem Typ-I-Rezeptor bewirkt, die zur Phosphorylierung des Serin- oder Threonin-Rests im zytoplasmatischen Teil des Typ-I-Rezeptors und zu dessen Aktivierung führt (Wrana, Attisano et al. 1994; Souchelnytskyi, ten Dijke et al. 1996; Fuentealba, Eivers et al. 2007). Durch Phosphorylierung und Aktivierung des Typ-I-Rezeptors kommt es zur Freisetzung der sonst blockierten Typ-I-Kinase im Typ-I-Rezeptor. Die Funktion des BMP-Signalwegs (Abb. 5) wird über diese Phosphorylierung kontrolliert und stellt eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung weiterer Protein-Protein-Interaktionen während der BMP-Signaltransduktion dar. Liegt der Typ-I-Rezeptor durch die Bindung eines BMP-Liganden aktiviert vor, so assoziiert dieser darauf mit einem inaktiven zytoplasmatischen SMAD und phosphoryliert dieses (Heldin, Miyazono et al. 1997). Die Typ-I-Kinasen phosphorylieren und aktivieren die SMAD-Proteine 1, 5 oder 8, die im Nukleus die Genexpression regulieren (Moustakas,

Souchelnytskyi et al. 2001; Shi and Massague 2003). Nach ihrer Phosphorylierung dissoziieren die SMAD-Proteine von den Rezeptorkomplexen. Die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung der SMAD1, SMAD5, und SMAD8 Proteine führt zur Bildung eines oligomeren Komplexes mit SMAD4 (Co-SMAD). SMAD4 besitzt eine Funktion bei der Regulierung, Effizienz und Translokation von SMAD-Komplexen in den Zellkern. Während BMPs die Proteine SMAD1, 5 und 8 aktivieren, aktivieren TGF- β und Aktivin SMAD2 und SMAD3 (Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001).

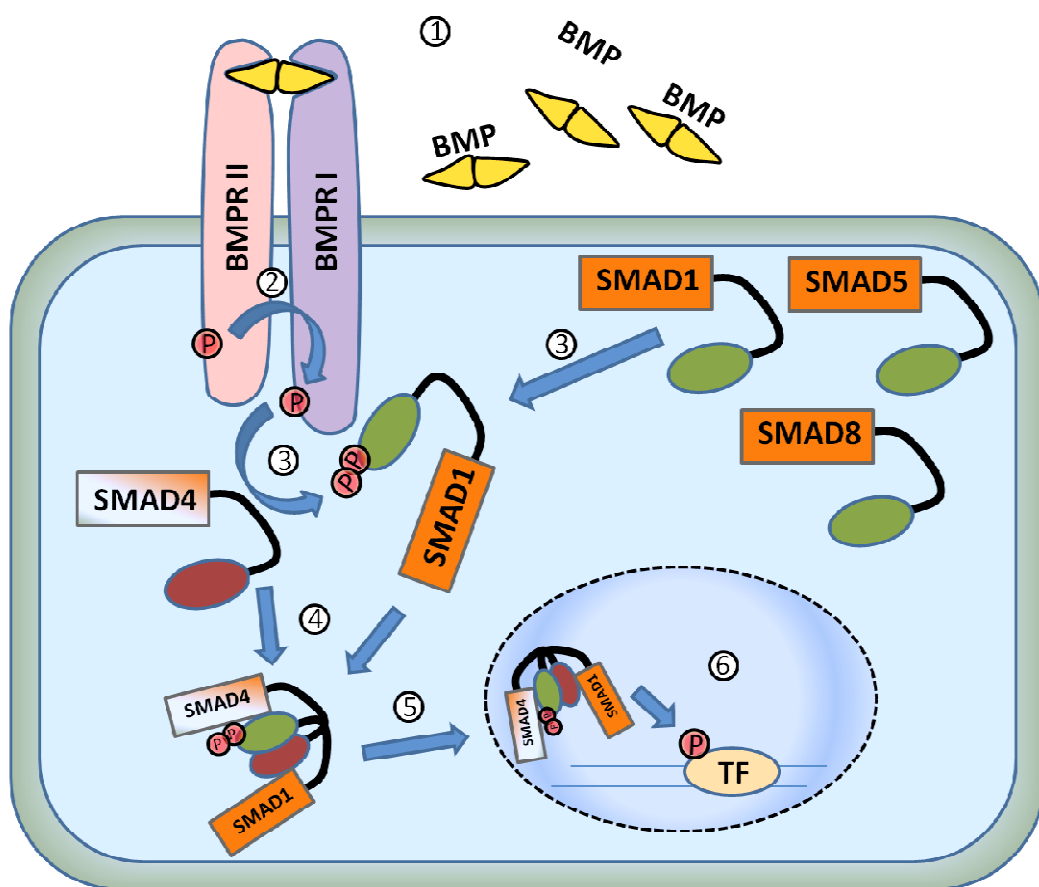


Abbildung 5: BMP-Signalweg und SMAD-Aktivierung

Das Schema zeigt (1) die Bindung des BMP-Liganden an den BMPRII und BMPRI Rezeptor, die Phosphorylierung und damit die Aktivierung des BMPRI Rezeptors durch den BMPRII Rezeptor (2), den aktivierten BMPRI Rezeptor und die inaktiven SMADs1/5/8, sowie diphosphoryliertes SMAD1 (3), eine Komplexbildung phosphorylierter SMADs mit SMAD4 (Co-SMAD) (4), wie das Heterodimer aus phosphoryliertem SMAD (SMAD1) und SMAD4 in den Zellkern transloziert (5) und wie das aus Co-SMAD und P-SMAD (phosphoryliertes SMAD) gebildete Heterodimer im Zellkern durch Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren regulierend auf die Expression der Zielgene wirkt (6).

1.4.2.8. Die WNT-Familie

Die Namensgebung der WNT-Familie geht auf die Verschmelzung zweier Genbezeichnungen zurück. Der Wortstamm des in *Drosophila* untersuchten Gens: „*wingless*“ bildet gemeinsam mit dem homologen Gen „*integrated*“ (*Int 1*) die Bezeichnung *Wnt*. Während eine Mutation des *wingless* Gens bei *Drosophila* zur Bildung einer flügellosen Mutante führt, bildet das Gen *Int 1* bei der Maus oftmals Brusttumoren. Die Proteine der WNT-Familie bilden eine Gruppe sezernierter Signalmoleküle, die lokal Signalwege aktivieren können oder in Zellverbänden als Morphogene wirken. Als Signalmoleküle nehmen die Mitglieder der WNT-Proteinfamilie Einfluss auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung im frühen embryonalen Stadium und im adulten Organismus. Biomedizinisch ist die Funktion der WNT-Proteine von Interesse, da eine durch WNT-Proteine fehlgesteuerte Signaltransduktion zur Ausprägung unterschiedlichster Krankheitsbilder und zum Entstehen von Krebs führen kann. 19 unterschiedliche WNT-Proteine konnten bisher in den höheren Wirbeltieren und beim Menschen nachgewiesen werden. Die Proteine der Wnt-Familie sind sezernierte Glycoproteine, die durch konservierte Cysteinseitenketten charakterisiert sind. Historisch wurden die WNT-Proteine entsprechend ihrer Signaltransduktion in die Klasse der kanonischen und nicht-kanonischen WNT-Proteine unterteilt. Auf molekularer Ebene können die Mitglieder der WNT-Proteinfamilie unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktivieren. Neue Erkenntnisse belegen, dass einige WNT-Proteine sowohl dem kanonischen, als auch dem nicht-kanonischen Signalweg folgen (Kikuchi, Yamamoto et al. 2007). Das Protein WNT3a, „ein vor kurzem noch spezifischer Signaltransduktor für den kanonischen Signalweg“ (Kawano and Kypta 2003), ist laut Erkenntnissen der letzten zehn Jahre in der Lage, auch den nicht-kanonischen Signalweg zu aktivieren (Dawes, Sugiyama et al. 2013). Neuere Studien (Zeng, Awan et al. 2007; Gessert and Kuhl 2010; Abdul-Ghani, Dufort et al. 2011) haben gleiches für die Proteine WNT5a, WNT 11 und WNT2b gezeigt.

1.4.2.9. Der WNT-Signalweg

Die durch die Proteine der WNT-Familie vermittelte Signaltransduktion wird in einen kanonischen und einen nicht-kanonischen Signalweg unterteilt. Der kanonische Signalweg

folgt der Bindung des WNT-Proteins an einen transmembranen Frizzled Rezeptor, der eine Interaktion mit dem LRP5/LRP6 Rezeptor eingeht und über einen Komplex aus β -Catenin und TCF die Transkription von Zielgenen bewirkt (Abb. 6). Der nicht-kanonische Signalweg ist ebenfalls WNT-Protein vermittelt, führt nach der Bindung des Liganden mit dem Rezeptor aber nicht zur Interaktion mit dem LRP5/LRP6 Rezeptor und benötigt keinen Komplex aus β -Catenin und TCF zur Transkription der Zielgene.

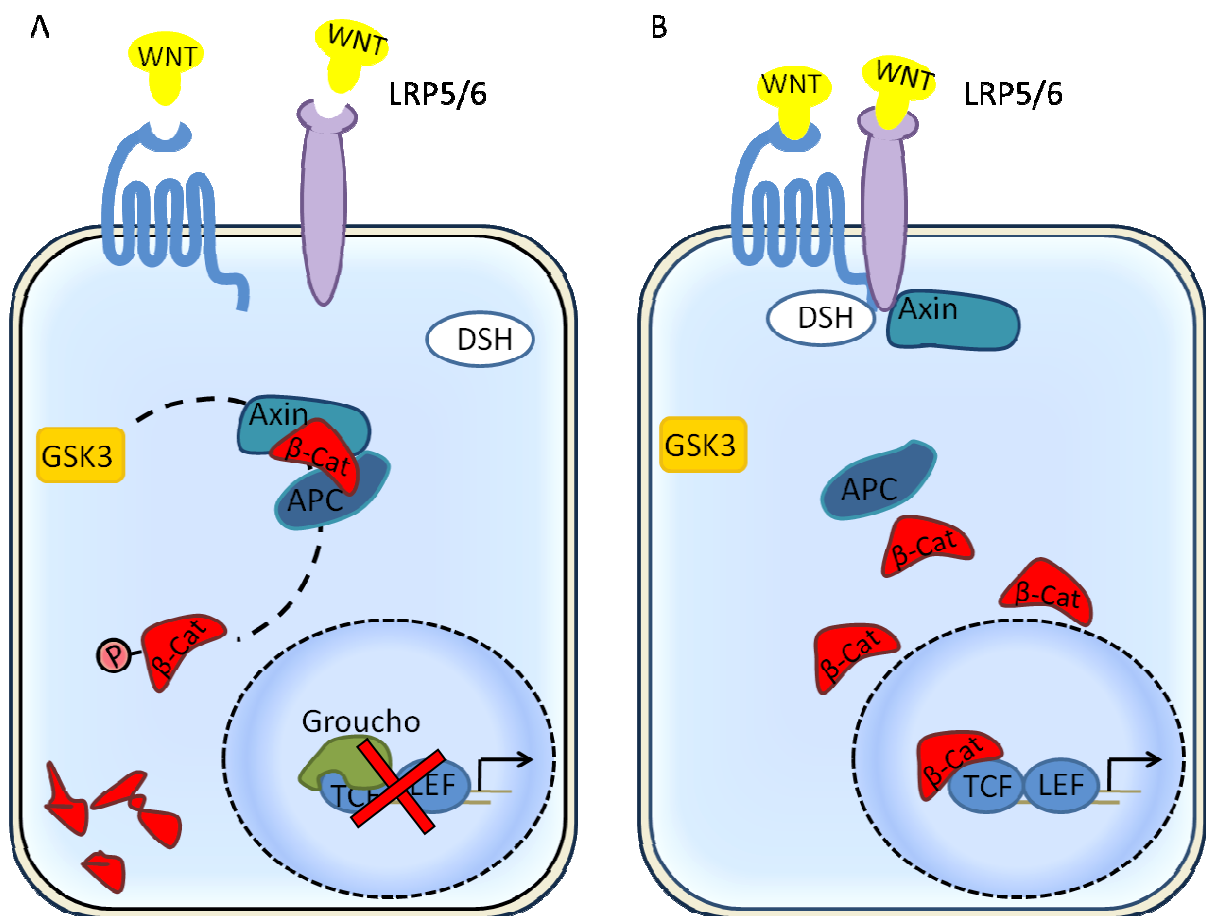


Abbildung 6: Der kanonische WNT-Signalweg

Das Schema zeigt (A) den inaktiven und (B) den aktivierten kanonischen WNT-Signalweg. (A) Im inaktiven kanonischen WNT-Signalweg bindet das WNT-Protein nicht an die Rezeptoren „Frizzled“ und LRP5/6, wodurch die Proteine Axin und APC einen gemeinsamen Komplex mit β -Catenin eingehen. Das in diesem Komplex bereits einfach phosphorylierte β -Catenin wird durch die GSK3- β anschließend erneut phosphoryliert. Die zweifache Phosphorylierung von β -Catenin führt zur Degradation von β -Catenin im Zytoplasma. (B) Im aktivierten kanonischen WNT-Signalweg bindet das WNT-Protein an den transmembranen „Frizzled“-Rezeptor und den LRP5/LRP6-Rezeptor. Durch die Bindung mit dem WNT-Liganden bilden die Rezeptoren einen heterodimeren Rezeptorkomplex (Clevers and Nusse 2012). Axin bindet an den LRP5/LRP6-Rezeptor und DSH an den „Frizzled“-Rezeptor. Die Proteine DSH und Axin gehen über die Bildung der Dix-Domäne eine Bindung ein. Durch die Bindung von Axin und DSH kommt es nicht zur Aufrechterhaltung des β -Catenin spaltenden

Proteinkomplexes (Axin, GSK-3 β und APC), was dazu führt, dass sich β -Catenin im aktivierten kanonischen WNT-Signalweg im Zytoplasma anreichert. Im Zytoplasma angereichertes β -Catenin transloziert in den Zellkern und führt dort zur Verdrängung des Korepressors Groucho und zur Transkription der Zielgene.

1.4.2.10. Der kanonische WNT-Signalweg

Ein Signalweg gilt als kanonisch, wenn dessen Verlauf entsprechend einer ursprünglich entdeckten Abfolge (Norm) verläuft. Der kanonische WNT-Signalweg (Abb. 6) wird über die Bindung eines WNT-Proteins an den transmembranen „Frizzled“-Rezeptor und den LRP5/LRP6-Rezeptor aktiviert. Diese Bindung führt dazu, dass sich beide Rezeptoren annähern und einen gemeinsamen heterodimeren Rezeptorkomplex bilden (Clevers and Nusse 2012). Die Signalweiterleitung von der äußeren Seite der Zellmembran auf die zytoplasmatische Seite der Zelle geschieht durch eine Strukturänderung des transmembranen „Frizzled“-Rezeptors, der den WNT-Liganden auf der äußeren Seite der Zellmembran bindet. Durch die strukturelle Änderung des transmembranen „Frizzled“-Rezeptors kann das zytoplasmatische Protein „DSH“ an den inneren Bereich des „Frizzled“-Rezeptors auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle binden. Durch diese Bindung kommt es zu unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen des DSH-Proteins (Yanagawa, van Leeuwen et al. 1995). Es ist davon auszugehen, dass das DSH-Protein das WNT-Signal in die Zelle weiterleitet (Chen, Xu et al. 2003). Der LRP5/LRP6-Rezeptor erfährt wie der transmembrane „Frizzled“-Rezeptor durch die Bindung des WNT-Proteins eine Phosphorylierung, die zur Strukturänderung des Rezeptors führt (Tamai, Zeng et al. 2004). Durch diese Strukturänderung kann das zytoplasmatische Protein Axin an den LRP5/LRP6-Rezeptor binden. Das an den „Frizzled“-Rezeptor gebundene DSH und das an den LRP5/LRP6-Rezeptor gebundene Axin bilden im kanonischen Signalweg ein Homodimer über die Dix-Domäne (eine Domäne aus Aminosäureseitenketten) aus (Hedgepeth, Deardorff et al. 1999). Gemeinsam sind die Proteine Axin und DSH an der Regulation der β -Catenin Konzentration innerhalb der Zelle beteiligt. Da die Transkription der Zielgene innerhalb des aktivierten kanonischen WNT-Signalwegs β -Catenin vermittelt abläuft, ist sowohl die Konzentration von β -Catenin innerhalb der Zelle als auch der Transport von β -Catenin in den Zellkern von Bedeutung. Der aus Axin, GSK3- β (Glykogen synthase Kinase-3 β) und APC (Adenomatous Polyposis Coli) bestehende Proteinkomplex, der im inaktiven kanonischen WNT-Signalweg

den Abbau von β -Catenin reguliert, liegt im aktivierten kanonischen WNT-Signalweg nicht vor. Eine Erklärung für den nicht vorhandenen Abbau von β -Catenin durch den Komplex aus APC, Axin und GSK3- β könnte sein, dass das über die Dix-Domäne homodimerisierte Axin dem β -Catenin abbauenden Komplex nicht mehr zur Verfügung steht (Cliffe, Hamada et al. 2003). Eine andere Erklärung könnte sein, dass das phosphorylierte Protein DSH die Dissoziation der GSK3- β aus dem β -Catenin abbauenden Komplex bewirkt, so dass die Degradierung von β -Catenin in der Zelle unterbunden ist (Lee, Ishimoto et al. 1999). Gelangt das im Zytoplasma angereicherte β -Catenin in den Zellkern, bedingt es dort über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TCF die Verdrängung des Korepressors Groucho und führt zur Transkription von Zielgenen. Ist der kanonische WNT-Signalweg inaktiv, wird die Konzentration von β -Catenin im Zytoplasma einer Zelle durch den Proteinkomplex aus den Proteinen APC, Axin, CK1 und GSK3- β niedrig gehalten. Das Protein β -Catenin bildet im inaktiven kanonischen *Wnt*-Signalweg einen gemeinsamen Komplex mit den Proteinen APC und Axin. Innerhalb dieses Komplexes kommt es nun zu einer zweifachen Phosphorylierung des β -Catenins durch die Kinasen CK1 α und GSK3- β . Zuerst phosphoryliert die Serin Threonin Kinase CK1 α das β -Catenin. Das Protein Axin bildet in diesem Komplex das Gerüst für die zweite Phosphorylierung des β -Catenins durch die Proteinkinase GSK3- β (Yost, Torres et al. 1996). Das zweifach phosphorylierte β -Catenin wird ubiquitiniert und von Proteosomen abgebaut (Aberle, Bauer et al. 1997).

Der Kinase-Inhibitor Alsterpaullone inhibiert spezifisch die Funktion der GSK3- β (Broun, Gee et al. 2005) und imitiert dadurch den kanonischen WNT-Signalweg. Durch die Hemmung der GSK3- β kommt es zur Akkumulation von β -Catenin im Nukleus (Broun, Gee et al. 2005). Dies führt zur Transkription von Zielgenen des WNT-Signalwegs. Experimente an Hydra haben gezeigt, dass die Behandlung mit Alsterpaullone eine Hochregulierung von *hyWnt3a* (Hydra *Wnt3a*) induziert (Guder, Philipp et al. 2006).

1.4.2.11. Der nicht-kanonische WNT-Signalweg

Für immer mehr WNT-Proteine, die klassisch nur einem Signalweg zugeschrieben wurden (Kawano and Kypta 2003), konnte im letzten Jahrzehnt der Nachweis erbracht werden, dass

sie nicht ausschließlich einem Signalweg, sondern sowohl dem kanonischen als auch dem nicht-kanonischen Signalweg folgen (Qu, Wang et al. 2013).

Als kanonisch ist die WNT-Signaltransduktion zu verstehen, die über die Bindung des WNT-Proteins an einen WNT-Rezeptor erfolgt und über β -Catenin im Zellkern zur Transkription der Zielgene des WNT-Signalwegs führt. WNT-Protein vermittelte Signalwege, die nicht über die Bindung an den LRP5/LRP6-Rezeptor und über β -Catenin im Zellkern erfolgen, werden als nicht-kanonische WNT-Signalwege bezeichnet (Abb. 7). Der nicht-kanonische WNT-Signalweg ist von Bedeutung für die Anordnung des Zytoskeletts und für die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Veeman, Axelrod et al. 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass sich der nicht-kanonische WNT-Signalweg auf den kanonischen WNT-Signalweg auswirkt und diesen hemmen kann (Veeman, Axelrod et al. 2003; Logan and Nusse 2004; He and Axelrod 2006).

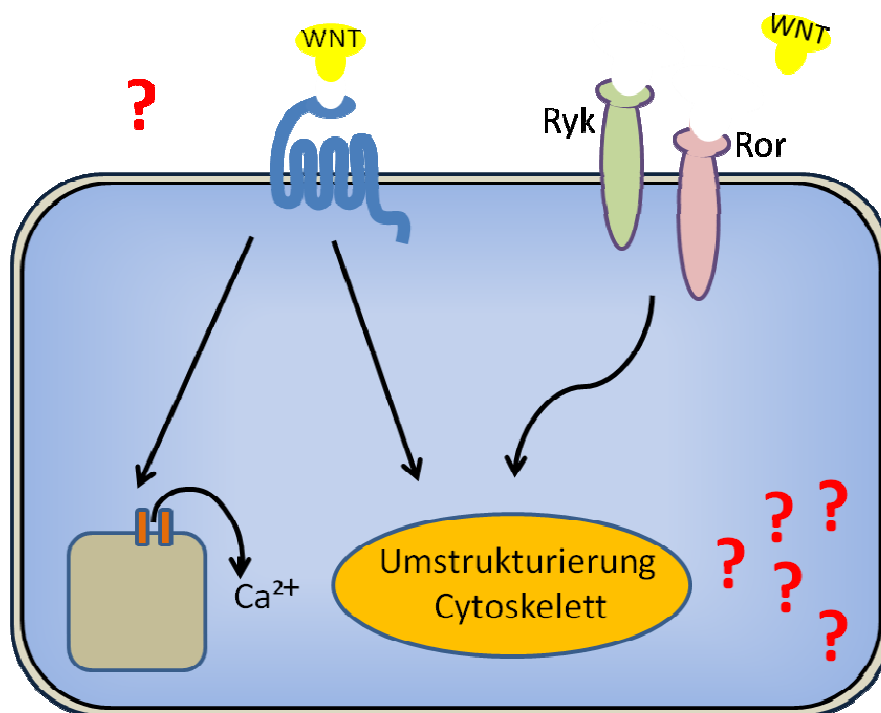


Abbildung 7: Der nicht-kanonische WNT-Signalweg

Das Schema zeigt den nicht-kanonischen WNT-Signalweg. Der nicht-kanonische WNT-Signalweg wird durch die Bindung der WNT-Liganden an den transmembranen Frizzledrezeptor, den Ryk- und Ror-Rezeptor und andere potentielle Rezeptoren aktiviert. Auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle aktiviert der nicht-kanonische WNT-Signalweg die Freisetzung von Ca^{2+} und die Umstrukturierung des Zytoskeletts. Der nicht-kanonische WNT-Signalweg steht im Verdacht bei einer Vielzahl von weiteren Signalen, wie z.B. auch der Modulation des kanonischen WNT-Signals von Bedeutung zu sein (rote Fragezeichen = unbekannte Faktoren des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs).

1.4.2.12. Hemmung des WNT-Signalwegs

Antagonisten des WNT-Signalwegs können in drei funktionelle Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe der sFRP-Antagonisten bilden die Proteine der sFRP-Familie, das Protein WIF-1 und das Protein Cerberus (Abb. 8). Alle sFRP-Proteine binden direkt an die WNT-Proteine und blockieren die Bindung des WNT-Proteins an den transmembranen „Frizzled“-Rezeptor oder den LRP5/LRP6-Rezeptor. Die Gruppe der Dickkopf-Antagonisten besteht aus Proteinen der Dickkopf-Familie, die an den LRP5/LRP6-Rezeptor binden und auf diese Weise eine Bindung des WNT-Proteins mit dem LRP5/LRP6-Rezeptor blockieren (Abb. 8). Durch die Proteine der Dickkopf-Familie wird eine Interaktion des transmembranen „Frizzled“-Rezeptors und des LRP5/LRP6-Rezeptors zum heterodimeren Rezeptorkomplex unterbunden (Kawano and Kypta 2003). Die neueste Gruppe bekannter WNT-Antagonisten bildet die Gruppe der Proteine, die gemeinsam mit den WNT-Proteinen um die Bindung mit dem transmembranen „Frizzled“-Rezeptor konkurrieren. Das Protein TSUKUSHI und dessen Isoformen binden direkt an den transmembranen „Frizzled“-Rezeptor und inhibieren den kanonischen WNT-Signalweg (Ohta, Lupo et al. 2004). Neben den beschriebenen inhibitorischen Proteinen können auch WNT-Proteine des nicht-kanonischen Signalwegs den kanonischen Signalweg inhibieren (Torres, Yang-Snyder et al. 1996).

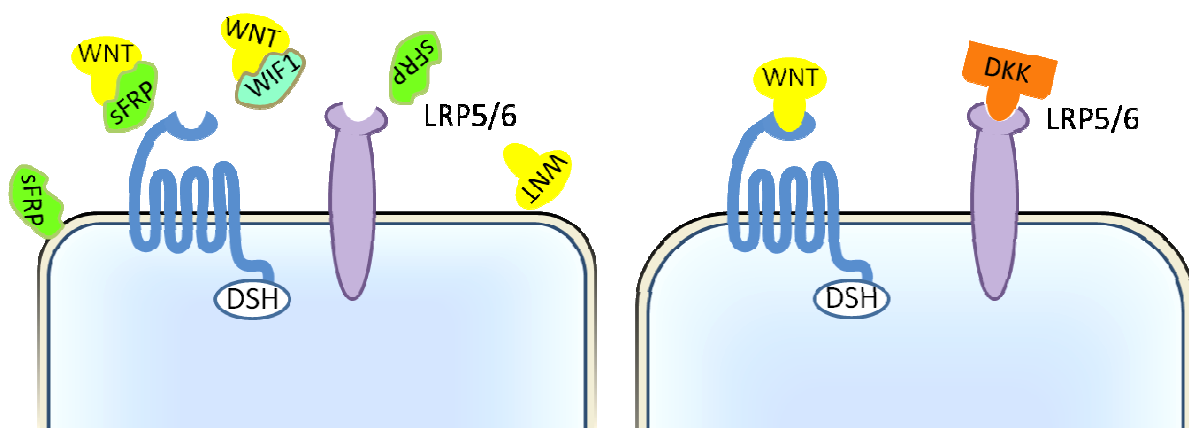


Abbildung 8: Inhibitoren des WNT-Signalwegs

WIF- und sFRP-Proteine binden direkt an die WNT-Proteine und blockieren sowohl den kanonischen wie auch nicht-kanonischen WNT-Signalweg. Proteine der Dickkopf (DKK)-Familie binden selektiv an den LRP5/LRP6 Rezeptor und blockieren dadurch ausschließlich den kanonischen WNT-Signalweg.

1.4.2.13. Signalwege, die sich auf der Stufe der SMAD-Protein-Phosphorylierung überschneiden.

Die Überschneidung verschiedener Signalwege auf der Stufe der SMAD-Phosphorylierung wurde zum ersten Mal für den BMP- und EGF-Signalweg anhand humaner Zelllinien gezeigt (Kretschmar, Doody et al. 1997). Neuere Studien bezüglich der Embryonalentwicklung von *Xenopus* haben erwiesen, dass SMAD1 eine Funktion während der Überschneidung des BMP/BMP Rezeptor-Signalwegs mit dem FGF/MAPK und dem WNT/GSK3- β Signalweg besitzt (Eivers, Fuentealba et al. 2008). Inaktive SMAD-Proteine werden während der aktivierten BMP-Signaltransduktion phosphoryliert und wirken dann in ihrer aktivierten Form als regulatorische Elemente auf die Transkriptionsfaktoren der Genregulation des BMP-Signalwegs. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass FGFs den BMP-Signalweg durch Phosphorylierung der Linker-Region in SMAD1 inhibieren (Eivers, Fuentealba et al. 2008). Bei Mausmutanten, die eine phosphorylierungsresistente Form des SMAD1-Proteins überexprimieren, konnte nachgewiesen werden, dass die BMP-inhibierende Wirkung durch FGFs verloren geht (Sapkota, Alarcon et al. 2007). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch der WNT-Signalweg Einfluss auf die Funktion der SMAD-Proteine nimmt. Der kanonische WNT-Signalweg verläuft über die Hemmung der GSK3- β . Die im inaktiven WNT-Signalweg aktive GSK3- β phosphoryliert nur im Bereich der Linker-Region prä-phosphorylierte oder markierte Proteine. Im Fall von SMAD1/5/8 führt die MAP Kinase zur primären Phosphorylierung der Linker-Region, was die zweite inhibitorische Phosphorylierung von SMAD1 durch die GSK3- β zur Folge hat (Fuentealba, Eivers et al. 2007). In der Linker-Region zweifach phosphoryliertes SMAD1 wird aus dem Kern heraus transportiert, ubiquityniert und abgebaut. Durch die GSK3- β Hemmung wird die Stabilität von aktivem SMAD1 erhöht, so dass ein aktiviertes BMP/pSMAD Signal länger aufrecht erhalten bleibt. Studien an *Xenopus* haben gezeigt, dass WNT-Signale die normal die GSK3- β regulieren Ektoderm dazu bringen können, ein epidermales Zellschicksal anzunehmen. Dieser WNT vermittelte Effekt benötigt einen aktivierten BMP-SMAD1/5/8 Signalweg (Fuentealba, Eivers et al. 2007). Im Gegensatz dazu führt das Zusammenwirken der FGF/MAPK und der GSK3- β Kinase des inaktiven WNT-Signalwegs zur Induktion eines neuralen Zellschicksals (Fuentealba, Eivers et al. 2007; Eivers, Fuentealba et al. 2008). Die in

dieser Arbeit dargestellte Studie untersucht die Funktion der SMAD-Proteine im Bezug auf die Bildung der frühen dorso-ventralen Musterbildung im Augenvesikel.

1.5. FGFs aus dem Oberflächenektoderm induzieren die Netzhautentwicklung

Im frühen Neuroepithel des Augenvesikels werden anfänglich eine Reihe unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel *Pax6*, *Otx2*, *Rx3* und *Six3* koexprimiert, bevor der Augenvesikel in eine RPE- und NR-Domäne gegliedert wird (Martinez-Morales, Rodrigo et al. 2004; Esteve and Bovolenta 2006; Adler and Canto-Soler 2007). Die Transkriptionsfaktoren *Mitf* (microphthalmia-associated transcription factor) und *Vsx2* (*visual system homeobox2*) (vormals *Chx10*) sind die ersten spezifischen Marker für retinale Merkmale und RPE-Merkmale, die im optischen Vesikel exprimiert werden (Liu, Chen et al. 1994; Fuhrmann, Levine et al. 2000).

Die Mitglieder der FGF-Familie sind potenzielle Kandidaten, die bei der NR-Entwicklung eine Rolle spielen könnten. Das Oberflächenektoderm bildet eine Quelle zahlreicher FGFs (de longh and McAvoy 1993; Desire, Head et al. 1998; Hyer, Mima et al. 1998; Nguyen and Arnheiter 2000). In der Maus konnten die Proteine FGF1 und FGF2 besonders stark im Oberflächenektoderm im Stadium des Augenvesikels nachgewiesen werden (Nguyen and Arnheiter 2000). FGF1 und FGF2 Proteine konnten zum Embryonaltag (E) 9,5 im gesamten Augenvesikel der Maus gleichmäßig verteilt gezeigt werden (Nguyen and Arnheiter 2000). Zusätzlich zum FGF1 und FGF2 Protein wurden im Stadium HH11 im Augenvesikel des Huhns Transkripte der FGF-Rezeptoren (FGFR) gefunden. Das gleichzeitige Vorhandensein von Ligand und Rezeptor zu den frühen Stadien der Augenentwicklung im Huhn weist auf eine mögliche Funktion der FGFs während der frühen Musterbildung im Auge hin. Neben FGF1 und FGF2 stehen weitere FGFs im Verdacht eine mögliche Funktion auf die Augenentwicklung zu besitzen. *Fgf8* ist im Neuroepithel des Huhns im Stadium HH11-13 in direkter Nachbarschaft zur vorläufigen Linsenplakode exprimiert (Vogel-Höpker, Momose et al. 2000). In der Maus können auch *Fgf15*-Transkripte im distalen optischen Vesikel im Stadium E 9,0-9,5 nachgewiesen werden (McWhirter, Goulding et al. 1997; Murali, Yoshikawa et al. 2005). Experimente haben gezeigt, dass FGFs *in vivo* und *in vitro*

prospektives RPE-Gewebe in NR-Gewebe umwandeln können (Pittack, Grunwald et al. 1997; Hyer, Mima et al. 1998; Fuhrmann, Levine et al. 2000; Vogel-Höpker, Momose et al. 2000). „Loss-of-function“-Studien, bei denen die FGF-Liganden wie auch Rezeptoren inhibiert bzw. blockiert wurden, zeigten keinen Einfluss auf die Netzhautentwicklung. So weisen zum Beispiel *Fgf1*-, und *Fgf2*-knockout Mäuse, wie auch *Fgf1/Fgf2* Doppelknockout Mäuse keine Defekte bei der Netzhautentwicklung auf (Dono, Texido et al. 1998; Ortega, Ittmann et al. 1998; Miller, Ortega et al. 2000). In hypomorphen *Fgf8* Mäusen und in *Fgf8* Zebrafischmutanten kommt es trotzdem zur Netzhautentwicklung (Picker, Brennan et al. 1999). Dies wirft Fragen nach der Redundanz von FGF-Signalen auf. Da mehrere FGFs bezüglich Ihrer Wirkung untereinander substituiert werden können (Holzmann, Grunt et al. 2012), ist noch unklar, welche Wirkung FGFs während der Netzhautentwicklung haben und ob FGFs essenziell für die NR-Entwicklung sind.

1.6. TGF- β -Familienmitglieder aus dem Mesenchym induzieren die frühe RPE-Domäne.

In Fortführung der bereits beschriebenen „klassischen Studien“ (Lopashov und Strovea) wurde in neueren Studien die Funktion des Mesenchyms auf die frühe Spezifizierung der RPE-Domäne im optischen Vesikel des Hühnerembryos unter Zuhilfenahme molekularer Marker untersucht (Fuhrmann, Levine et al. 2000). An optischen Vesikelexplantaten im Stadium HH11-13 wurde in Kultur die Bildung der frühen RPE-Domäne durch den Nachweis erster *Mitf*-Transkripte in Folge der mesenchymalen Ablation gezeigt. Durch die Entfernung des extraokularen Mesenchyms kommt es in der Explantatkultur zum Verlust der *Mitf*-Expression und zur Hochregulierung des NR spezifischen Markergens *Chx10* (Fuhrmann, Levine et al. 2000). In Anwesenheit extraokularer Gewebe konnten keine Einflüsse während der frühen Domänenspezifizierung in Kultur festgestellt werden (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Im Kontrast dazu wurde gezeigt, dass in Folge der Entfernung des extraokularen Mesenchyms das während der frühen Augenentwicklung NR spezifische Gen *Vsx2* hochreguliert ist. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass Signale aus dem Mesenchym während der Domänenspezifizierung antagonisierend auf Signale aus dem Oberflächenektoderm wirken (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Tatsächlich scheinen sich *Mitf*

und *Chx10*, die frühen Gene, die während der Spezifizierung der RPE- und NR-Domäne exprimiert werden, gegenseitig zu antagonisieren (Rowan, Chen et al. 2004; Horsford, Nguyen et al. 2005).

Experimente haben gezeigt, dass Activine die Funktion des Mesenchyms während der frühen Augenentwicklung substituieren können (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Die Zugabe von Activin, nicht aber von BMP5 oder BMP7, in das Kulturmedium der Explantatkultur führte zur Hochregulierung der RPE-spezifischen Marker *Mitf*, *Mmp115* und *Wnt13* im optischen Vesikel (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Es wird daher angenommen, dass für die frühe RPE-Spezifizierung im Huhn Activin ähnliche Signale verantwortlich sein müssen (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Im Huhn können im Stadium HH11 Transkripte der Activin-bindenden Rezeptoren Typ-IIA und Typ-IIB nachgewiesen werden. Während der Typ-IIA-Rezeptor im Stadium HH11 nur im Neuroepithel des optischen Vesikels exprimiert ist, finden sich Transkripte des Typ-IIB-Rezeptors sowohl im Neuroepithel als auch im Oberflächenektoderm und im extraokularen Mesenchym (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Im Gegensatz zu Ergebnissen beim Frosch und bei der Maus konnte im extraokularen Mesenchym beim Huhn bisher noch kein Activin nachgewiesen werden (Dohrmann, Hemmati-Brivanlou et al. 1993; Feijen, Goumans et al. 1994; Fuhrmann, Levine et al. 2000).

Obwohl die Zugabe von BMPs in das Kulturmedium der Vesikelexplantat-Kulturen nicht zur Induktion RPE-spezifischer Gene im Augenvesikel führte, weisen neuere Studien auf eine mögliche Funktion der BMPs während der Induktion der RPE-Domäne hin. Im Gegensatz zu den hier aufgeführten *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass BMPs an der frühen RPE-Spezifizierung im Hühnerembryo beteiligt sind (Müller, Rohrer et al. 2007). Während der frühen Stadien der Augenentwicklung zu (HH8) lassen sich *Bmp4*- und *Bmp7*-Transkripte bereits im Oberflächenektoderm über dem optischen Primordium nachweisen (Müller, Rohrer et al. 2007). Transkripte des *Bmpr-Typ-1a* sind bereits im Stadium HH8-10 im Neuroepithel des optischen Vesikels, dem Oberflächenektoderm und dem extraokularen Mesenchym nachweisbar (Lim, Cho et al. 2005). Interessanterweise sind *Bmp2* und *Bmp4*, sowie deren Rezeptoren *Typ 1a* und *1b* im initialen Augenvesikelstadium direkt unterhalb des Oberflächenektoderms exprimiert. Dies weist auf eine mögliche Funktion der BMPs während der frühen Augenentwicklung hin (Furuta, Piston et al. 1997; Trousse, Esteve et al. 2001; Hyer, Kuhlman et al. 2003).

Frühere Studien gingen davon aus, die Bildung der NR-Domäne noch vor der Bildung der RPE-Domäne durch *Vsx2* (vormals *Chx10*) Transkripte im Stadium HH10 im distalen optischen Vesikel nachweisen zu können (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Neuere Studien (Müller, Rohrer et al. 2007) haben jedoch gezeigt, dass der spezifische RPE-Marker MITF nicht wie ursprünglich angenommen erst im Stadium HH12 (Mochii, Mazaki et al. 1998), sondern bereits im Stadium HH9 im distalen optischen Vesikel nachgewiesen werden kann. Die im Stadium HH10 im distalen optischen Vesikel festgestellte *Vsx2*-Expression konzentriert sich auf den ventralen Bereich des distalen optischen Vesikels unterhalb des prospektiven Linsenektoderms (Müller, Rohrer et al. 2007).

1.7. WNT-Signale besitzen eine potenzielle Funktion während der RPE-Entwicklung.

Während der Augenentwicklung beim Huhn und der Maus können eine Vielzahl unterschiedlicher WNT-Liganden wie zum Beispiel WNT2, 5a, 6, 7a, 9a und 16 festgestellt werden (Jin, Burrus et al. 2002; Liu, Mohamed et al. 2003; Fokina and Frolova 2006). *Wnt2b* (vormals *cWnt13*) ist das früheste Mitglied der WNT-Familie, das während der Augenentwicklung in Maus und Huhn exprimiert wird (Fuhrmann, Levine et al. 2000; Müller, Rohrer et al. 2007; Fuhrmann 2008). Obwohl *Wnt2b* als ein spezifisches Gen während der frühen RPE-Entwicklung gilt (Fuhrmann, Levine et al. 2000), konnten bislang keine *Wnt2b*-Transkripte im frühen Augenvesikel nachgewiesen werden (Kitamoto and Hyer 2010). Stattdessen wurde zum optischen Vesikelstadium im Huhn eine aktive Genexpression von *Wnt2b* im dorsalen Oberflächenektoderm gezeigt (Cho and Cepko 2006). Im Oberflächenektoderm über dem prospektiven NR-Gewebe konnten keine *Wnt2b*-Transkripte detektiert werden (Cho and Cepko 2006). Experimente an Explantatkulturen optischer Vesikel haben gezeigt, dass es nach Ablation des extraokularen Mesenchyms nicht nur zum Verlust der RPE-spezifischen Genexpression von *Mitf*, sondern auch zum Verlust der *Wnt*-Expression kommt (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Die zum Zeitpunkt der frühen Augenbecherbildung im dorsalen RPE expandierende *Wnt2b*-Expression scheint also eine Funktion während der frühen Bildung des RPEs zu besitzen (Jasoni, Hendrickson et al. 1999; Kubo, Takeichi et al. 2003). Durch retrovirale Überexpression von konstitutiv aktivem β -

Catenin, welches im kanonischen WNT-Signalweg die Expression von Zielgenen reguliert, konnte ähnlich wie bei der ektopischen Expression von *Wnt2b* die Bildung einer dünneren NR beobachtet werden (Cho and Cepko 2006). Durch die Überexpression von *Wnt2b* und β -Catenin konnte innerhalb stark affektierter NR-Bereiche eine Verjüngung der retinalen Gewebe festgestellt werden, die in ihrer Ausprägung einer einzelnen Zelllage cuboidaler Zellen stark an die Morphologie des RPE-Gewebes erinnert (Cho and Cepko 2006). Die Überexpression von *Wnt2b* und β -Catenin führte jedoch nicht zur vollständigen Transdifferenzierung des NR-Gewebes zu RPE-Gewebe (Cho and Cepko 2006). Untersuchungen weisen stattdessen darauf hin, dass die Überexpression von *Wnt2b* in der NR zur Annahme eines peripheren Zellschicksals in Richtung der Iris oder der Ziliarkörperentwicklung führen (Cho and Cepko 2006).

1.8. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zellulären und molekularen Signale zu identifizieren, die für die Spezifizierung des RPEs im sich entwickelnden Hühnerauge verantwortlich sind. Dem bisherigen Modell der Augenentwicklung entsprechend, induzieren Signale aus dem Mesenchym die RPE Entwicklung in Wirbeltieren. Da die Expression von *Mitf* im prospektiven RPE zu einem Zeitpunkt im Huhn detektiert wurde, bei dem noch keine mesenchymalen Zellen in den Augenbereich eingewandert sind, könnten auch Signale aus dem angrenzenden Oberflächenektoderm für die Induktion der RPE Entwicklung verantwortlich sein. Durch eine Kombination von embryo- und molekularbiologischen Methoden *in vivo* und *in vitro*, sollten in dieser Arbeit durch „gain-of-function“ und „loss-of-function“ Experimente Signalmoleküle identifiziert werden, welche die RPE-Spezifizierung in neuroepithelialen Zellen des Augenvesikels im Huhn induzieren. Dabei sollten meine Untersuchungen Aufschluß darüber geben, ob einzelne, oder eine Kombination von Signalen der BMP- und WNT-Familie eine Rolle bei der RPE-Entwicklung spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können zu einem besseren Verständnis der Augenentwicklung in Wirbeltieren beitragen. Weiterhin könnte diese Arbeit wichtige Erkenntnisse für die regenerative Medizin bringen, um zum Beispiel eine höhere Ausbeute an RPE Gewebe aus humanen retinalen Stammzellen, für die Transplantation, zu generieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris)	Roth, Karlsruhe
3, 3`-Diaminobenzidine (DAB)	Sigma, Deisenhofen
4`,6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Serva, Heidelberg
5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Agarose	PeqLab, Erlangen
Alkaline Phosphatase	Roche, Mannheim
Acetylthiocholinjodid (ATC)	Sigma, Deisenhofen
Auftragspuffer DNA (6x)	Roth, Karlsruhe
Blocklösung („Blocking Reagent“)	Roche, Risch, CH
BW284c51	Sigma-Aldrich, Steinheim
Denhardt`s Lösung	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Dextransulfat-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe

D(+)- Saccharose	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
100 bp DNA-Leiter, extended	Roth, Karlsruhe
dNTP- Mix	Eppendorf, Hamburg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O	Sigma, Deisenhofen
Entellan Neu	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, JP
Eosin Gelb	Chroma-gesellschaft Schmidt GmbH, Münster
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fast green	Merck, Darmstadt
Fötales Kälber-Serum	Sigma, Deisenhofen
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
iso-OMPA Tetraisopropylpyrophosphoramide	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth, Karlsruhe

Ladepuffer	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	AppliChem, Darmstadt
Mikroskopische Hämalun-Lösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Nile Blue A sulfate	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Nitroblau-Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Pikrinsäure	AppliChem, Darmstadt
Tissue Tek Neg50	Richard-Allen-Scientific, Kalamazoo, MI, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylol	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Zusammensetzung chemischer Lösungen

4% Paraformaldehyd (PFA) (pH=7,3)	4 % Paraformaldehyd in PBS
-----------------------------------	----------------------------

Bouin`s Fixativ	71,4 % Pikrinsäure, 23,8 % Formalin, 4,8 % Essigsäure
DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat in Wasser.
Entellan-Lösung	50 % Entellan Neu in Xylol
Fast green-Lösung	0,02 % Fast green in DEPC-H ₂ O
Hanks`-Lösung	9,8 g Hank`s balanced salt in 1 l dH ₂ O
PBS (pH 6,8)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , in DEPC-H ₂ O.
Tinte	10 Tropfen "Scribtol"-schwarz in 10 ml PBS
Tris-HCl	0,2 M Tris in HC ₂ O, pH mit HCl eingestellt

2.1.3. Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die *in situ* Hybridisierung

10xSalz	126 mM Tris pH=7,5, 1,85 M NaCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM EDTA.
---------	---

20xSSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0.
50x TAE (pH=8,5)	2MTris, 50mM EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O, 4% Essigsäure
AP-Puffer	100 mM Tris (pH 9,5), 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20.
Hybridisierungspuffer	50% deionisiertes Formamid, 10% 10xSalz, 10% Dextransulfat, 10% Hefe-RNA, 0,1% 50x Denhardt`s in DEPC-H ₂ O
MABT-Puffer	100 mM Maleinsäure (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20.
Waschlösung	50% Formamid, 0,1% Tween 20, 20x SSC.

2.1.4. Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die Immunohistochemie

PBST	0,5% Triton X-100 in PBS
------	--------------------------

TBSA	0,1% Triton X-100, 5% BSA in PBS
------	----------------------------------

2.1.5. Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die HE Färbung

Eosin-Lösung	1 % „Eosin-Yellow“ in dH ₂ O
Hämatoxylin-Lösung	25 % Hämalan-Lösung nach Mayer (für die Mikroskopie) in dH ₂ O
Salzsäure –Alkohol-Lösung	1 % HCl in 70% Ethanol

2.1.6. Zusammensetzung von Medien für die Organkultur

DMEM (200 ml)	1,9 g DMEM Pulver, 2 ml Sodium Pyruvate, 6 ml 20% Glucose, 280 mg Natriumbikarbonat, 12 mg Kanamycin, 194 ml dH ₂ O.
---------------	--

2.1.7. Primäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti DIG Fab Fragmente	Roche, Risch, CH
PY489-βCatenin Anti-Maus, Monoclonal	DSHB, Iowa, USA

MITF Anti-Hase, Polyklonal HPA003259	SIGUMA, St.Louis, MO, USA
MMP115 Anti-Maus, Monoclonal	Geschenk: Prof. Dr Mochii, Hyogo Universität, Japan
PAX7 Anti-Maus, Monoclonal	R&D System, MN, USA
Phospho-SMAD1/5 Anti-Hase, Polyklonal 9516	Cell Signaling,
RPE65 Anti-Maus, Monoclonal	NOVUS, Abingdon, United Kingdom

2.1.8. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Esel gegen Hase, Alexa488 gekoppelt	DianAugenvesikela, Hamburg
Esel gegen Hase, Cy3 gekoppelt	DianAugenvesikela, Hamburg
Ziege gegen Hase, Alexa488 gekoppelt	DianAugenvesikela, Hamburg
Ziege gegen Maus, Cy3 gekoppelt	DianAugenvesikela, Hamburg

2.1.9. „beads“

Affi-Gel Agarose „beads“	BioRad, München
1-X2 Resin „beads“	BioRad, München

2.1.10. Proteine und Chemikalien für die „bead“-Applikation

Alsterpaullone	Sigma, Deisenhofen
BMP5, recombinant Human	PeproTech, Hamburg
BMP7, recombinant Human	PeproTech, Hamburg
DKK1, recombinant Human	PeproTech, Hamburg
Noggin, recombinant Human	PeproTech, Hamburg
sFRP1, recombinant Human	PeproTech, Hamburg
WIF1, recombinant Human	R&D Systems, McKinley Place NE Minneapolis, MN, USA
WNT3a, recombinant Murine	PeproTech, Hamburg

2.1.11. Geräte

Abzug 2-453-DAHD	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Analysenwaage 2004MP	Sartorius, Göttingen
Autoklav VX-150	Systech, Wettenberg
Binokular Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Eierinkubator BSS300	Ehret, Emmendingen
Elektrophorese-Kammer	Peq-Lab, Erlangen
Gefrierschrank Liebherr	ProfiLine, Bieberach an der Riß
Gelapparatur	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Bioblock Scientific Thernolyne corp., USA
Heizplatte Präzitherm 28-1	Störk-Tronic Störk GmbH&CO. KG., Stuttgart

Instrumentenschalen mit Deckel 30cm x 24cm x 4cm	Bochem
Inkubator T6060 (ISH)	Hereaus, Hanau
Kameras: Nikon DS-Fi 1 Nikon SMZ 1500 AxioCam Mrm	Nikon, Tokyo, JP Nikon, Tokyo, JP Carl Zeiss, Jena
Kryostat HM550	Microm, Walldorf
Laborwaage 1202MP	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope: Axiophot x10 Observer D1 Axiovert S100 Nikon H550L Olympus SC35	Carl Zeiss, Jena Carl Zeiss, Jena Nikon, Tokyo, JP Olympus, Hamburg
pH-Meter pH 523	WTW, Weilheim
Sartorius 2004MP MJ-500	Waagen-Kissling
Spektralphotometer UV/VIS Lambda 2	Perkin Elmer, Langen
Stromversorgungsgerät 2301 Macro Drive 1	LKB Bromna, Midland, ON, Canada
Tischzentrifuge C-1200	Labnet, Woodbridge, NJ
Vortexer Top-Mix 94323	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänigsen

Wärmeschrank Heraeus Instruments	Heraeus, Hanau
----------------------------------	----------------

2.1.12. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Cryomold Gefrierbehälter 10 mm x 10 mm x 5 mm	Tissue-Tek,
Deckgläser 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Eier	LSL, Dieburg
Einmal-Injektions-Kanülen Sterican 0,90 x 40 mm, Ø20 Gx 1 ¹ / ₂	Braun, Melsungen
Einmal-Mikropipetten	Brand,
Einmalspritze 5 und 10 ml	Braun, Melsungen
Eppendorf Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Gefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Goldfolie	Eberhardt Faber,
Klebefilm	Tesa, Hamburg
Objektträger 75 x 25 mm x 1.0 mm SuperFrost Plus	Thermo Scientific, Langenselbold
Parafilm	NeoLab, Heidelberg
Petrischalen 35 x 10 mm 60 x 15 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 90 x 150 mm	Greiner, Frickenhausen

Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5	Sarstedt, Nümbrecht
Tesa film	Tesa, Hamburg
Tinte Scribto! Schwarz	Pelikan, Hannover
TissueTek	Leica-Microsystems, Wetzlar
Tusche A 17	Pelikan, Hannover
Zentrifugenröhren 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereitung der Embryonen

Die Eier des weißen Legehuhns *Gallus gallus*, *Linnaeus* (LSL, Dieburg) wurden bei 37-38°C sowie 60-65% Luftfeuchte bebrütet und bis zu den gewünschten Stadien inkubiert. Für die spätere Präparation wurden die Eier in horizontaler Lage inkubiert. Mittels einer 10 ml-Spritze und einer weitlumigen Kanüle (1,2 x 40) wurde 4 ml Eiweiß pro Ei im Bereich der stumpfen Seite abgesaugt. Im stumpfen Bereich des Eies befindet sich eine Luftblase, die den Dotter und den Embryo vor Verletzungen beim Eindringen mit der Kanüle schützt. Das entfernte Albumin bewirkt das Absinken des nahe an der Eischale auf dem Dotter liegenden Embryos. Anschließend wird ein kreisförmiges Fenster auf der Oberseite des Eis geöffnet. Um den Embryo besser zu erkennen, wird sterile Tinte in den Dotter unter den Embryo gespritzt. Die morphologische Zuordnung der Embryonen in ihren Entwicklungsstadien erfolgt nach Hamburger und Hamilton (HH) (Hamburger and Hamilton 1951). Für diese Arbeit wurden Stadien von HH 8-11 und HH 17 und 33 verwendet (Abb. 9). Anschließend wird das Fenster bis zum Beginn der Manipulation mit Klebefilm (Tesa) verschlossen. Durch die Inzisierung des Chorions und Amnions wird der Embryo freigelegt und das Auge für die Manipulation zugänglich (Abb. 9). Die zu den unterschiedlichen Stadien manipulierten

Embryonen werden je nach Versuch bis zu fünf Tage zwecks fortschreitender Entwicklung im Ei belassen. Die Entwicklung zwischen den unterschiedlichen Stadien wird am Stereomikroskop (Nikon) anhand des Herzschlags überprüft. Bei stark veränderten Vitalzeichen (schwacher Herzschlag, schlecht ausgebildete Blutgefäße) werden die Embryonen sofort fixiert (4%PFA).

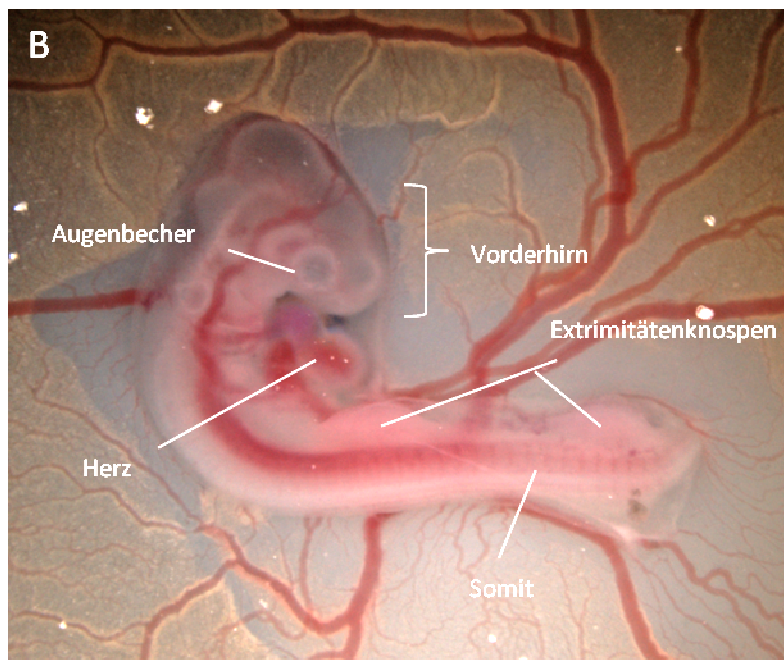
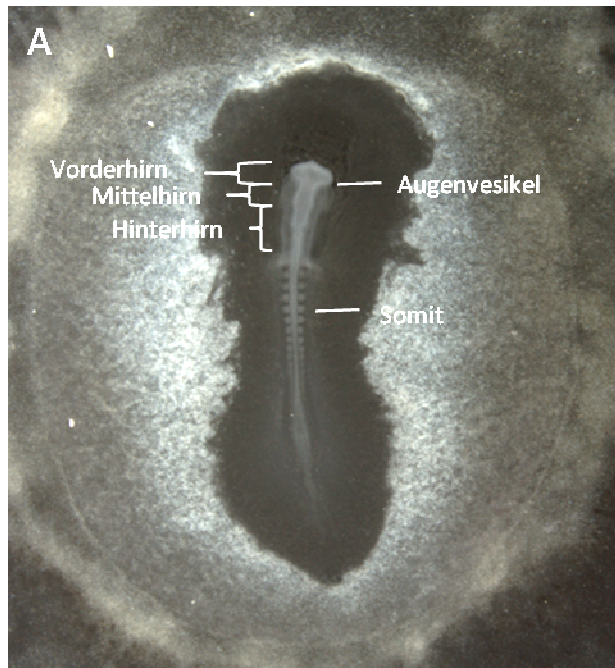


Abbildung 9: Embryonale Strukturen während der Entwicklung des Hühnerembryos.

A: HH9 B:HH18

2.2.2. Die Herstellung von Präparationsbestecken

Für Operationen am Embryo, Gewebemanipulationen und die „bead“-Applikation ist der Gebrauch feinsten Instrumente von Bedeutung. Da die auf dem Markt erhältlichen Instrumente in der Anschaffung oft sehr kostenintensiv und für den individuellen Gebrauch nur begrenzt einsetzbar sind, wurden Instrumente wie Wolfram-Mikronadeln (sog. „tungsten needles“, Abb. 10/11A) und feinste Messer für die in dieser Arbeit beschriebenen Studien selbst hergestellt.

2.2.3. Die Herstellung von Wolfram-Mikronadeln und Glasnadeln

Die für die Mikrodissektion verwendeten Präpariernadeln werden elektrolytisch bei einer Spannung von 140 V und 0,70 mA in konzentrierter NaOH-Lösung (6N NaOH) aus einem Wolframdraht ausgezogen ($W + 2NaOH + 2H_2O \xrightarrow{Cu^{2+}} Na_2WO_4 + 3H_2$) (Abb. 10). Damit die produzierte Wolfram-Mikronadel spitz zuläuft, ist es notwendig diese während der Elektrolyse innerhalb der NaOH-Lösung auf und ab zu bewegen. Ein andauerndes Bad des Wolframdrahtes in der NaOH-Lösung führt ansonsten dazu, dass der Draht gleichmäßig dünn wird, keine Spitze ausbildet und während der Manipulation schneller abbricht.

Glasnadeln wurden aus Glaskapillaren (Einmal-Mikropipetten, Brand, Cat.No. 708733) von Hand über einer Kerzenflamme ausgezogen und am vorderen Ende zusammengeschmolzen (Abb. 11C).

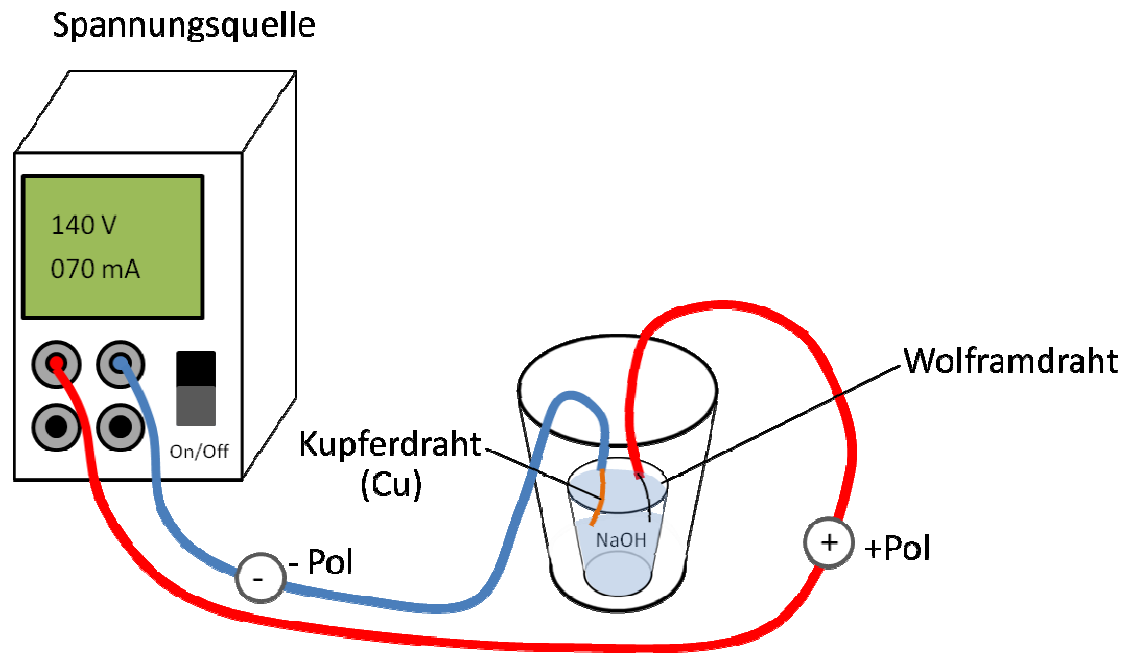


Abbildung 10: Die Herstellung von Wolfram-Mikronadeln

Das Schema zeigt, wie die Wolfram-Mikronadeln für die Mikrodissektion hergestellt werden. Die Spitzen der Präpariernadeln werden mit Hilfe der Elektrolyse ausgezogen. Der Kupferdraht wurde am -Pol und der Wolframdraht am +Pol montiert. Bei einer Spannung von 140 V und 0,70 mA in 6N NaOH-Lösung wurde der Wolframdraht innerhalb der NaOH-Lösung auf und ab bewegt.

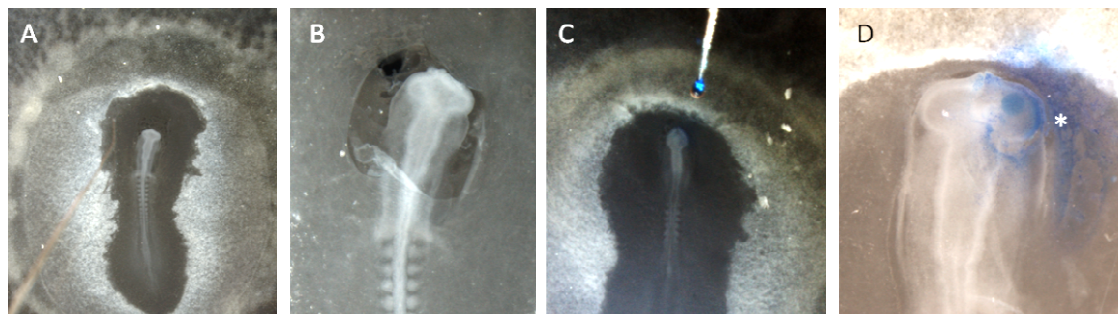


Abbildung 11: Manipulation mit hergestellten Wolfram-Mikronadeln und Glaskapillaren:

A: Größenvergleich der dünn ausgezogenen Wolfram-Mikronadel mit dem Embryo. B: Durch die Entfernung der Vitellinmembran mittels Wolfram-Mikronadel wird der Embryo für die „bead“-Applikation vorbereitet. C: Die Glasnadel über dem Embryo. Die Spitze der Nadel wurde mit 0,2-2% Nil Blau Sulfat gelöst in 1,2% Agarose beschichtet. Zur Entfernung des Oberflächenektoderms wurde die mit Nil Blau Sulfat beschichtete Glasnadel mehrfach über das Oberflächenektoderm bewegt, so dass sich das Oberflächenektoderm in Folge der Wirkung von Nil Blau leichter vom Augeneskel ablöst. D: In Folge der Nil Blau Sulfat Behandlung (bläuliche Färbung des Augeneskels) lässt sich das Oberflächenektoderm leicht entfernen. Ein in das behandelte Auge applizierter Agarose-„bead“ ist deutlich zu erkennen (Stern in D).

2.2.4. Die Herstellung von feinen Messern

Die für die Dissektion der Augenvesikel verwendeten Messer werden aus Stecknadeln der Marke Prym angefertigt, da diese einen Metallkern, anstatt eines Hohlraums besitzen. Im Wesentlichen beschränkt sich die Herstellung der feinen Messer aus Stecknadeln auf mehrere Schritte von Schleifarbeiten mit unterschiedlichen Geräten und Materialien. Im ersten Schritt erhält die Stecknadel einen Grobschliff durch eine Schleifscheibe (Dremel) an zwei sich gegenüberliegenden Seiten im oberen Drittel der Nadel. Der Feinschliff führt dazu, dass sich eine klingenähnliche abgeflachte Spitze bildet. Im zweiten Schritt wird dann mit Schleifpapier (Körnung 200) so lange Material von den beiden Seiten abgetragen, bis sich das Messer an der Spitze deutlich über Dreiviertel des Ausgangsmaterials verjüngt hat. Abschließend werden die Schneidefläche und die Spitze des Messers mit Öl am Schleifstein herausgearbeitet.

2.2.5. Entfernung des Oberflächenektoderms vom Augenvesikel

Das dem optischen Vesikel anliegende Oberflächenektoderm wurde mikrochirurgisch bei Embryonen in den Entwicklungsstadien zwischen HH8-HH10 unter Verwendung von Nil Blau Sulfat (NBS, „nile blue A sulfate“) entfernt (Abb. 11: C, D). Das in niedrigen Konzentrationen als Lebendfarbstoff genutzte NBS (Weimer, 1927) wurde in dieser Studie zur Färbung und Ablösung des Oberflächenektoderms von darunter liegenden Geweben verwendet (2% NBS in Agarose). Das NBS wurde mit Hilfe einer am vorderen Ende zusammengeschmolzenen Glaskapillaren aufgetragen. Nach kurzer Einwirkzeit wirft das durch das NBS angefärbte Oberflächenektoderm Blasen und lässt sich mit einer dünn ausgezogenen Wolframnadel leicht entfernen (Geetha-Loganathan et al. 2010, Hyer et al. 2003). Durch die Applikation von NBS im Bereich der ventralen Augenvesikel ist die Gefahr gegeben, dass NBS den sich entwickelnden Herzbeutel des Embryos angreift. Um den Embryo vor zu starken NBS-Konzentrationen im Bereich des sich entwickelnden Herzbeutels zu schützen, empfiehlt es sich, das NBS direkt nach der Behandlung des Embryos im Ei durch die Zugabe von wenigen Tropfen PBS zu verdünnen.

2.2.6. „bead“-Applikation

Ein Großteil der in dieser Arbeit dargestellten funktionellen Studien wurde durch die Technik der „bead“-Applikation durchgeführt. Die Applikation von Agarose- oder Resin-„beads“ eröffnet die Möglichkeit, Funktionsanalysen von Proteinen, Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren in definierten Geweberegionen zu bestimmten Zeitpunkten durchzuführen. Die kommerziell verfügbaren „beads“ (Affi-Gel Agarose “beads” und 1-X2 Resin “beads”) liegen in einer Größe von 70-150 µm (Mischung) vor. Es wird versucht möglichst gleichgroße „beads“ in die frühe Augenanlage oder in das zu untersuchende Gewebe einzubringen. Die gemäß ihrer Eigenschaften verwendeten „beads“ wurden in unterschiedlichen Faktoren (Helms, Thaller et al. 1994) in pharmakologisch relevanten Konzentrationen inkubiert (Tabelle 1, Abb. 12).

Tabelle 1

Proteine	Konzentrationen
BMP5, recombinant Human	0,125, 0,25, 0,5, 0,7, 1 µg/µl
BMP7, recombinant Human	0,5, 0,7 µg/µl
Noggin, recombinant Human	1 µg/µl
WNT3a, recombinant Murine	1 µg/µl
sFRP1, recombinant Human	2 µg/µl
DKK1, recombinant Human	1 µg/µl
WIF1, recombinant Human	1 µg/µl
Alsterpaullone	1 µg/µl

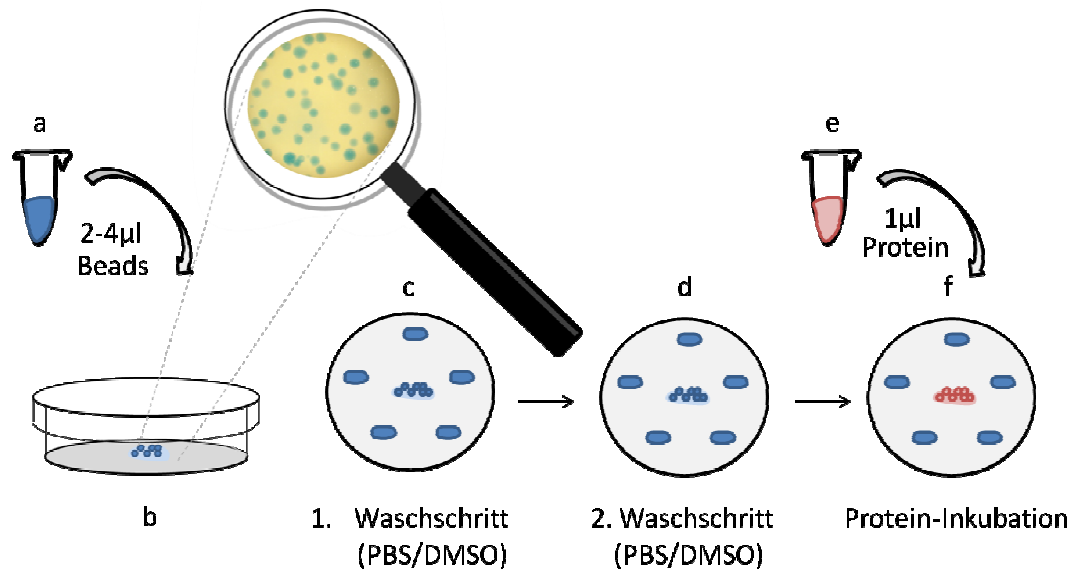


Abbildung 12: Vorbereitung der „bead“-Applikation

(a) Zwei bis 4 µl der „bead“-Lösung werden in eine Petrischale pipettiert. (b) Für die Manipulationen am Embryo werden ungefähr gleichgroße „beads“ (~100 µm) verwendet. (c, d) Die „beads“ werden in zwei Waschschriffen in 5 µl PBS (Agarose-„beads“) oder DMSO (Resin-„beads“) inkubiert. Damit die „beads“ während der Inkubationszeiten in den unterschiedlichen Lösungen nicht eintrocknen, werden jeweils fünf Tropfen (3-5 µl) PBS um die „beads“ herum platziert. (e, f) Danach werden die „beads“ in 1 µl Protein oder Wirkstoff überführt und für 1 Stunde inkubiert.

2.2.6.1. Resin-„beads“

AG1-X2 Resin-„beads“ sind aus Resinen, stark basischen Anionenaustauschern aufgebaut, deren Porengröße durch die Vernetzung der Resine untereinander bestimmt wird. AG1-X2 Resin-„beads“ besitzen eine nur geringe Vernetzung der Resine untereinander, so dass Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht verwendet werden können.

2.2.6.2. Agarose-„beads“

„Blue Gel“ Agarose-„beads“ (Affi-Gel) sind mit dem blauen Farbstoff Cibacron Blue F3GA gebunden. Dieser Farbstoff ermöglicht zB. sowohl ionische, als auch hydrophobe schwache und reversible Bindungen.

2.2.6.3. „bead“-Implantation/Embryo Manipulation

Die Implantierung der „beads“ erfolgt durch einen kleinen Schnitt mit Hilfe einer dünn ausgezogenen Wolframnadel in der Midline des sich entwickelnden Vorderhirns. Die mit einer Pinzette über der Operationsstelle platzierten „beads“ werden durch die Wolframnadel in das Vorderhirn bewegt und so platziert, dass sie im Bereich des distalen Augenvesikels zum Liegen kommen. Da sich der Hühnerembryo während seiner Entwicklung im Ei meistens auf die linke Seite dreht, wurde, um den Verbleib der „beads“ im manipulierten Augenveikels so lange wie möglich sicherzustellen, im späteren Verlauf dieser Studie darauf geachtet, dass „beads“ hauptsächlich in den linken Augenvesikel implantiert wurden. Danach wurden die Eier bei 37°C für weitere 24 bis 72 Stunden inkubiert.

2.2.7. Elektroporation

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode, um DNA, „ribonucleic acid“ (RNA) oder siRNA in eine Zelle einzubringen. Grundlegend für diese Technik ist die Erkenntnis, dass Biomembranen durch kurze elektrische Impulse permeabel werden, ohne dadurch Schaden zu nehmen (Neumann and Rosenheck 1972; Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982). Durch die Elektroporation können im Hühnerembryo lokal genetische Funktions- oder Verlustanalysen durchgeführt werden (Nakamura, Katahira et al. 2004). Durch den Gebrauch einer Nadel aus Wolframdraht als Kathode und einem dünnen Platindraht als Anode ist es möglich, im Bereich des Augenvesikels räumlich begrenzt genetisches Material in den Hühnerembryo zu transfizieren (Abb. 13). Die in dieser Studie im Bereich des Augenvesikels eingebrachte siRNA wurde mittels einer spitz ausgezogenen 50 µl Kapillare durch eine Inzision im Prosenzephalon in das Augenvesikel appliziert. Um Kathode und Anode in der Nähe des Embryos platzieren zu können, ohne diesen mechanisch zu verletzen, sollte die Vitellin Membran noch vor der Inzision mit drei bis vier Tropfen PBS überschichtet werden. Durch das PBS sinkt der der Vitellin Membran anliegende Embryo ab. Während der Elektroporation ist darauf zu achten, dass sich die Anode so nah wie möglich am zu elektroporierenden Gewebe befindet, ohne dieses zu berühren. Das Berühren des Gewebes mit der Anode führt zu Verbrennungen. Eine erfolgreiche Elektroporation erkennt man

durch Blasenbildung an der Anode (im Bereich des Prosenzephalons). Um eine Schädigung des Embryos zu vermeiden, werden zwei Impulse mit einer Dauer von 30 msek. bei einer Spannung von 7 Volt im Abstand von 970 msek. gesetzt.

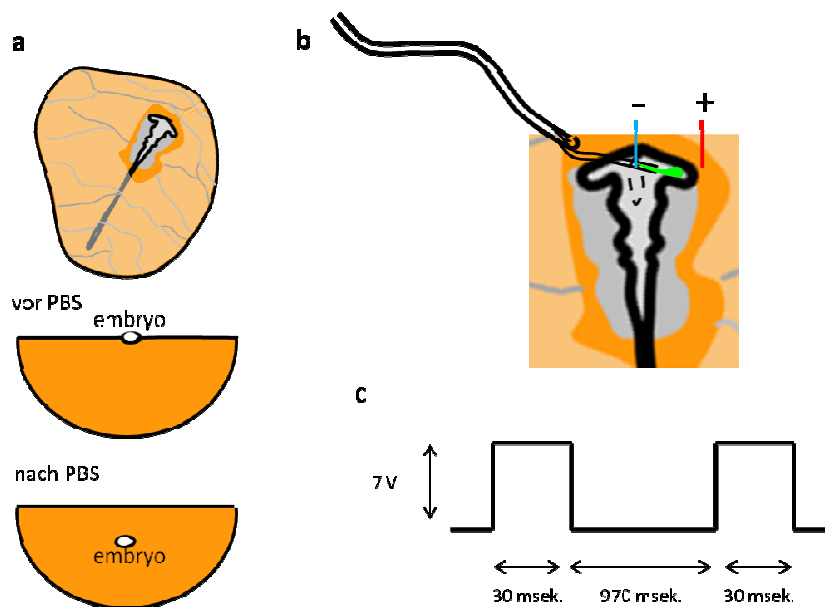


Abbildung 13: Elektroporation

(a) Vor dem Schnitt in die Vitellin Membran wurde der Embryo mit drei bis vier Tropfen PBS überschichtet, sodass der Embryo durch das PBS unterhalb der Vitellin Membran absinkt. (b) Die siRNA wurde mittels einer spitz ausgezogenen 50 µl Kapillare in das Augenvesikel appliziert. Kathode und Anode wurden in der Nähe des Embryos platziert. (c) Die Elektroporation wurde in zwei aufeinander folgenden Zyklen von 30 mSek. bei 7V durchgeführt. Zwischen den Stromflüssen lag eine Pause von 970 mSek.

2.2.8. Herstellung von Augenvesikelexplantaten (Organkultur)

2.2.8.1. Vorbereitung der Kultur-Einsätze

Die in der Organkultur Verwendung findenden Zellkultur-Einsätze werden mit gekühlter 2 mM HCl-Lösung (Salzsäure) und 3 mg/ml Kollagen („Cellmatrix Typ-1C“) beschichtet. Für die Beschichtung eines Einsatzes wird jeweils 1 ml 2mM HCl und 3 mg/ml Kollagen verwendet (Abb. 14). Die zur Beschichtung verwendeten Lösungen sollten, um die Temperatur gering zu halten, während dem sterilen Arbeiten am Flaschenhals nicht abgeflammt werden. Die mit Medium beschichteten Zellkultur-Einsätze werden in einer 6-Loch-Platte bei 30°C für 1

Stunde inkubiert. Der flüssige Überstand (HCl-Lösung) wird abgesaugt. Die mit „Cellmatrix Typ-1C“ beschichteten Einsätze können bei RT für 4 Wochen aufbewahrt werden. Vor der weiteren Verwendung sind die Zellkultur-Einsätze mit autoklaviertem destillierten Wasser (oder Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser) zu waschen. Die Zellkultur-Einsätze werden hierzu zur Hälfte mit Wasser gefüllt, geschüttelt und wieder entleert.

2.2.8.2. Operation und Kultivierung

Für die Organkultur wird das komplette Prosencephalon von Embryonen im Stadium HH10 isoliert. Die Isolation erfolgt außerhalb des Eies auf einem kontrastreichen und sterilen schwarz eingefärbtem Silikon. Das zu kultivierende Gewebe wird in Hanks'-Lösung gewaschen und mit einer Pipette auf die mit Typ-1C beschichteten Membranen (1:5 Kollagen/2% HCL) des Falcon-Zellkultur-Einsatzes überführt. Da die Gewebe an der Pipette oder an anderen Instrumenten leicht anhaften, werden diese während der Operation in BSA gewaschen. Nach der Überführung der Gewebe in die Zell-Kultur-Einsätze wurde die überschüssige Hanks'-Lösung abgezogen, sodass die Gewebe an der mit Kollagen beschichteten Oberfläche zum weiteren Anwachsen anhaften. Die Zell-Kultur-Einsätze werden im Anschluss in geeignete 6-Loch-Platten (Sigma-Aldrich) überführt (Abb. 14). Jedem Loch wird zur weiteren Kultur der Gewebe 2 ml Lösung einer 10%igen FBS-Lösung (GIBCO), gelöst in DMEM zugegeben. Die Inkubation der Organkulturen erfolgte bei 37°C für maximal vier Tage.

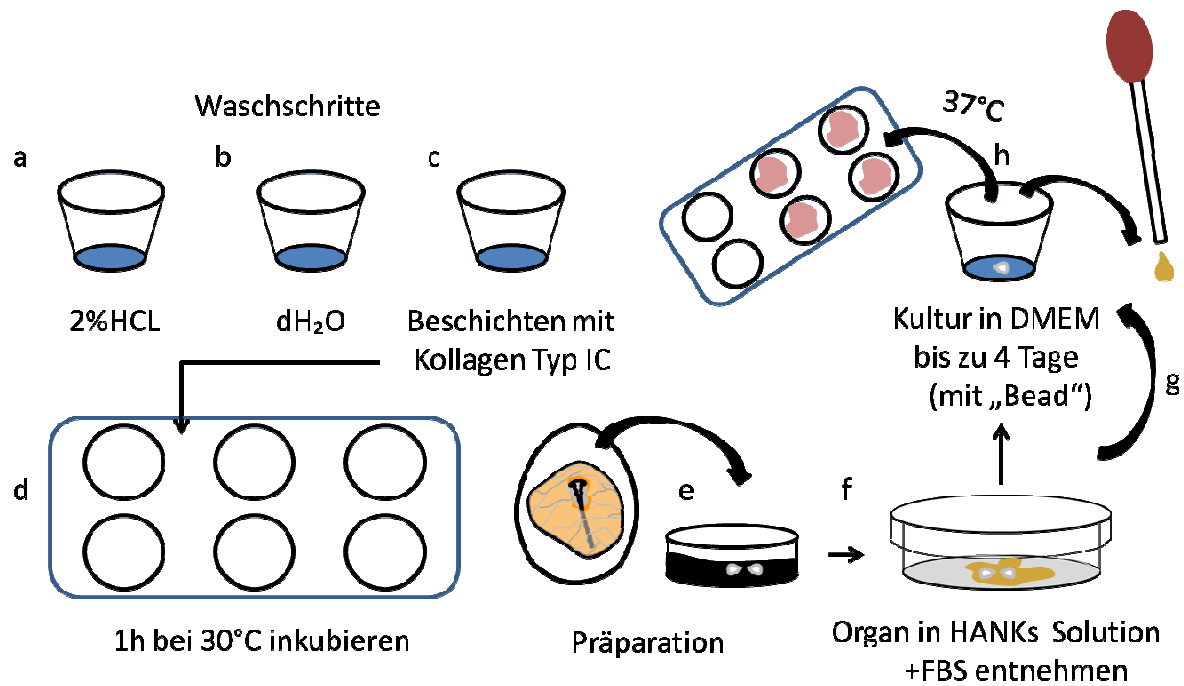


Abbildung 14: Organkultur mittels Kultur-Einsatz

(a,b) Die Kultur-Einsätze werden für die Beschichtung mit Kollagen Typ-1C (c) mit 2% HCL und dH₂O gewaschen. (d) Die mit Kollagen Typ-1C beschichteten Zell-Kultur-Einsätze werden für eine Stunde bei 30°C inkubiert. (e) Das zu kultivierende Gewebe wird dem Donor in einer schwarzen Silikonschale entnommen. (f) Das operierte Gewebe wird in Hanks'-Lösung gewaschen und in den Zell-Kultur-Einsatz überführt. (h) Die restliche Hanks'-Lösung wird verworfen und das am Boden des Zell-Kultur-Einsatzes anhaftende Gewebe gemeinsam mit dem Insert bei 37°C in DMEM in einer geeigneten Sechs-Loch-Platte bis zu 4 Tagen inkubiert.

Die beschriebene Technik der Organkultur wurde in dieser Studie dazu genutzt, Effekte durch die Applikation des spezifischen GSK3-β-Inhibitors Alsterpaullone (AP) auf die Augenentwicklung *in vitro* zu untersuchen. Mit Hilfe einer feinen Pinzette wurde den aus dem Prosencephalon auswachsenden Augenvesikeln zu diesem Zweck ein AP-„bead“ (1,0 µg/µl) auf das linke auswachsende Augenvesikel und ein Kontroll-DMSO-„bead“ auf das rechte auswachsende Augenvesikel appliziert. Die Kulturen werden nach 33 Stunden in 3 ml einer 2%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 3 Stunden bei 4°C fixiert. Danach werden die Bildung der RPE-Domäne und eine vorhandene Pigmentierung analysiert.

2.2.9. Die Anfertigung histologischer Gefrierschnitte

Zur Anfertigung der Gewebedünnschnitte am Kryostaten (Gefriermikrotom) wurden die in PFA fixierten Embryonen stufenweise in 10% und 20% Sucrose überführt, um ein Ablösen der NR vom RPE zu vermeiden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Embryonen in den Lösungen vollständig abgesunken waren. Um Querschnitte vom Gewebe (Abb. 15) anfertigen zu können, wurden die Embryonen in einer Silikonform in NEG 50 (Thermo Scientific) oder Surgipath (Leica) unter dem Binokular ausgerichtet und auf der Schnellgefriereinheit des Kryostaten bei -40°C gefroren. Am Kryostaten wurden Schnitte von 8 bis 14 µm Schnittdicke bei einer Temperatur von -27 bis -25 °C angefertigt. Um ein Abschwimmen der Gewebedünnschnitte während der *in situ* Hybridisierung zu vermeiden, wurden die Gewebedünnschnitte auf SuperFrost-Objektträger aufgezogen und bei 37 °C auf der Heizplatte für ca. 30 Min. trocknen gelassen. Zur weiteren Lagerung wurden die noch nicht gefärbten Gewebeschnitte bei -20 °C inkubiert.

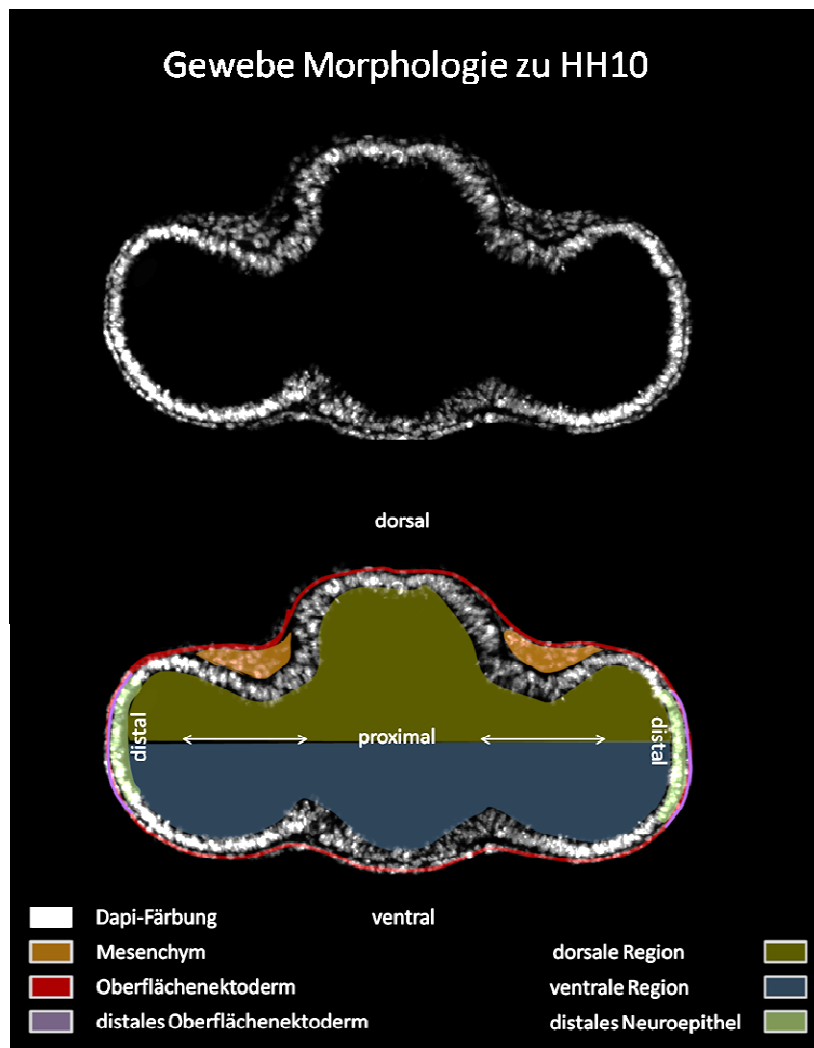


Abbildung 15: Dorso-ventrale Orientierung im Gefrierschnitt

Im dorso-ventralen Gefrierschnitt im Stadium HH10 ist distal das Oberflächenektoderm (violett) mit dem darunterliegenden distalen Neuroepithel des optischen Vesikels (grün) zu erkennen. Im dorso-ventralen Schnitt lässt sich das komplett vom Oberflächenektoderm (rot) umgebene Prosencephalon mit den nach distal auswachsenden optischen Vesikeln in einen dorsalen (transparent blau) und einen ventralen (transparent grün) Anteil unterteilen. Die ersten mesenchymbildenden Neuralleistenzellen (orange) sind zu diesem Zeitpunkt im dorsalen Prosencephalon lokalisiert.

2.2.10. Paraffinschnitte

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurden Gewebe und ganze Embryonen für zwei Stunden in einer Pikrinsäure haltigen Bouin-Lösung (Formalin: Pikrinsäure: Essigsäure = 5: 15: 1) fixiert. Durch die Fixierung mit Pikrinsäure ist eine bessere Färbung von Geweben mit anionischen Farbstoffen möglich, als dies durch eine Fixierung in PFA der Fall ist (Lang, 2008). Der Fixation in Pikrinsäure folgen drei Waschschrte in 90% Ethanol. Während der

ersten zwei Waschschriffe wird der Embryo kurz gewaschen. Der dritte Waschschriff erfolgt über Nacht. Für die Paraffin-Infiltration des Gewebes erfolgt eine Erwärmung des Paraffins auf 67°C. Das durch die Pikrinsäure gelb angefärbte Gewebe ermöglicht ein orientiertes Einbetten („Einblocken“) in das Paraffin. Aus praktischen Gründen wurden die Formen zum Einbetten in Paraffin aus Papier von Hand gefertigt. Das Produzieren der Einbett-Formen von Hand ermöglicht die Anpassung der Form an die Größe des zu verwendenden Gewebes und Paraffinvolumens. Alle in dieser Studie produzierten Paraffinschnitte wurden in einer Schnittdicke von 6 µm angefertigt. Die am Mikrotom in serieller Reihe hergestellten Schnitte wurden auf einem schwarzen Tonpapier so zugeschnitten, dass sie mit einer Pinzette auf einen zuvor mit einem Eiweißgemisch (Zwei Tropfen Eiweiß auf 50 ml Wasser) behandelten Objektträger transportiert werden konnten. Das Eiweißgemisch wird (mit dem Finger) auf der Oberfläche der Objektträger gleichmäßig verteilt und führt zu einem besseren Anhaften der Schnitte. Eine starke Blasenentwicklung auf der Oberfläche des Objektträgers weist auf zu viel Eiweiß in der verwendeten Lösung hin. Die auf diese Weise vorbereiteten Objektträger trocknen bei 37°C und werden vor dem Überführen der Schnitte großzügig mit Wasser überschichtet. Die mit Wasser beschichteten Objektträger liegen auf der Heizplatte bei 37°C, während die einzelnen Schnitte auf den Meniskus der Wassersäule überführt werden. Durch das auf 37°C erwärmte Wasser strecken sich die zum Teil gestauchten Paraffinschnitte auf der unter Oberflächenspannung stehenden Wassersäule und lassen sich mit Hilfe einer Nadel entsprechend positionieren.

2.2.11. Sondensynthese für die *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung mit einzelsträngigen RNA-Sonden ist von besonders hoher Qualität, da überschüssige nicht gebundene Sonden durch RNAsen abgebaut werden. Die in dieser Studie verwendeten Sonden wurden aus transformierten „desoxyribonucleic acid“ (DNA)-Eluaten oder aus bereits linearisierter DNA mittels In-vitro-Transkription (RNA-Synthese) hergestellt.

2.2.11.1. DNA-Elution von Papier

Der Transport und die Aufbewahrung von DNA Plasmiden kann auf einem markierten Stück Filterpapier erfolgen. Für die in dieser Arbeit dargestellten Studien wurden unterschiedliche DNA Plasmide aus Filterpapier eluiert. Das die DNA enthaltende Filterpapier wird hierzu ausgeschnitten und für 30 Minuten bei RT in 30 µl TE-Puffer (pH 8,0) inkubiert.

2.2.11.2. Transformation

Die Transformation der jeweiligen Plasmid-DNA (*Mmp115*, *Wnt2b* und *Vsx2*) erfolgt (über Vektoren des Typs pBSK) in DH5α Zellen. Einem auf 100 µl aliquotierten DH5α Stamm werden zu diesem Zweck 5 µl DNA zugegeben. Die nur durch ein leichtes Anschlagen mit dem Finger mit der DNA durchmischten Zellen werden für 20 Min. auf Eis inkubiert, bevor sie im Anschluss zum „heat-shock“ für 30 bis 120 Sek. bei 42°C inkubiert werden. Im Anschluss an den „heat-shock“ werden die Zellen kurz auf Eis inkubiert. Neben offener Flamme wird den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben. Die Zellen werden durch Invertieren gemischt und bei 37°C bei 200 rpm für eine Std. inkubiert (=Expression der Selektionsgene). Währenddessen sind bereits vorbereiteten LB-Platten zum folgenden Ausstreichen der Zellsuspension auf RT zu bringen. Um später einzelne Klone „picken“ zu können, sind die Zellen in unterschiedlichen Volumen (50 µl und 100 µl einer 1:100 Verdünnung) auf den LB-Platten auszustreichen.

2.2.11.3. Über-Nacht-Kultur

Um für die Sondensynthese genügend Plasmid-DNA vorrätig zu haben, sind einzelne Klone der transformierten Zellen zu picken und über Nacht zu kultivieren. Eine Selektion der transformierten Vektoren mit der gewünschten eingebrachten Plasmid-DNA erfolgt über Ampicillin. Hierzu werden Plasmide verwendet, die eine Ampicillin Resistenz auf ihrem Vektor tragen. Während für die Mini-Prep Ansätze in einem Volumen von 5 ml LB-Medium

mit Ampicillin [100 µg/ml] verwendet werden, werden für die Maxi-Prep Volumen von 250 ml verwendet. Die Kultur wird „über“ Nacht bei 37°C und 250 rpm wachsen gelassen. Damit die Zellen nicht zu dicht wachsen ist darauf zu achten, die Kulturen nicht vor dem späten Nachmittag anzupflanzen.

2.2.11.5. *In vitro*-Transkription

Je nach Sonde wurde 1 µg der jeweils vorliegenden DNA Probe in einen vorher zusammenpipetierten Mastermix (4 µl 5x Buffer, 2 µL DTT, 0,5 µL RNase-Inhibitor, 2 µl DIG-Mix, 2 µl RNA Polymerase in 20 µl DEPC-H₂O) eingesetzt und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss an die RNA-Synthese wurde durch die Zugabe von 1 µl DNase I und einer Inkubation für 30 Min. bei RT, um die Template-DNA zu verdauen. Gefällt wurde die RNA bei -20°C über Nacht in einer Lösung aus 3.5 µl 4 M LiCl and 100 µl 100 % Ethanol. Im Anschluss an die Fällung wurde die RNA für 30 Min. bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das RNA Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut für 30 Min. bei RT und 13000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss, wurde das Eppendorf Gefäß mit der abzentrifugierten RNA Probe bei RT geöffnet, bis der Ethanol vollständig verdampft war. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Ausbeute und Reinheit der synthetisierte RNA wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt.

Tabelle 2: Kombimnationen der Restriktionsenzyme und RNA Polymerasen

Gene	Restriktionsenzyme	RNA Polymerasen
<i>Vsx2</i>	Xba1	T3
<i>Mmp115</i>	Hind3	T7
<i>Mitf</i>	EcoR1	T7
<i>Wnt2b</i>	Xba1	T3

2.2.12. *In situ* Hybridisierung

Die Methode der *in situ* Hybridisierung dient dem Nachweis der Genexpression in einzelnen Zellen ganzer Embryonen (Wholemounts, WT) und Zellen histologischer Gewebeschnitte. Die *in situ* Hybridisierung ist daher auch ein spezifischer Nachweis für Genaktivität, indem man die „messenger“-RNA (mRNA) nachweist, die gerade von einem Gen transkribiert wird. Die hier verwendete *in situ* Hybridisierung wird dazu genutzt bestimmte Nukleinsäuresequenzen mittels einer RNA-Antisense (Sonde) zu detektieren, die das Reportermolekül Digoxigenin beinhaltet (Abb. 16). Ein Vorteil der *in situ* Hybridisierung mittels Digoxigenin-Molekülen gegenüber der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist die dauerhafte Färbung der Gewebe durch Indigoblau. Das Digoxigeninmolekül koppelt während der Sondensynthese an die C-5 Position des Uridin Nukleotids und ist durch die Verwendung eines mit alkaliner Phosphatase gebundenen Anti-Digoxigenin-Antikörpers histochemisch nachweisbar. Die Grundlage für den histochemischen Nachweis einer spezifischen Nukleinsäuresequenz, die über eine Digoxigenin beinhaltende Sonde mittels eines mit der alkalinen Phosphatase gebundenen Anti-Digoxigenin-Antikörpers nachgewiesen werden kann, bildet eine Farbreaktion der chemischen Substanzen Nitro Blue Tetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-toluidinsalz (NBT/BCIP). Bei einem pH-Wert von 9,5 setzt die an den Anti-Digoxigenin-Antikörper gebundene alkaline Phosphatase das Substrat BCIP um. Das Spaltprodukt Idoxyl wird durch NBT zu unlöslichem Indigo oxidiert (Wolenski, Layden et al. 2013). Es kommt zum violetten Farbniederschlag in den Zellen, die dieses Gen exprimieren. Durch mehrmalige Waschschrte nach der Hybridisierung wird ungebundene RNA-Sonde und Antikörper entfernt.

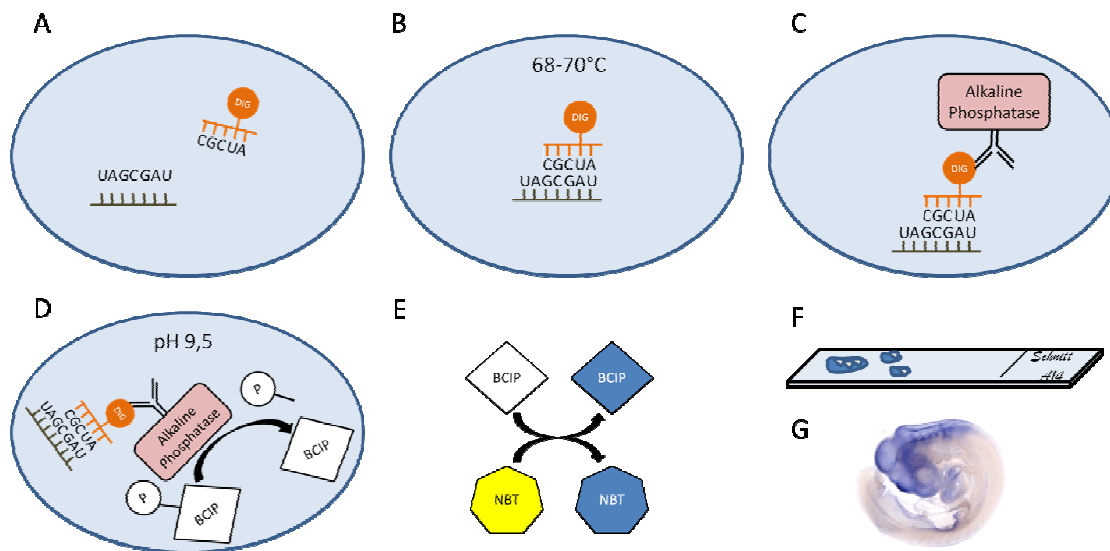


Abbildung 16: Der Nachweis von mRNA durch *in situ* Hybridisierung

(A) Zelle mit einer DIG-markierten Antisense-RNA-Sonde (orange) zum Nachweis einer spezifischen mRNA (grau). (B) Hybridisierung zwischen Sonde und nachzuweisender mRNA. (C) Bindung des mit der alkalischen Phosphatase gebundenen Antikörpers an die DIG-markierte Antisense. (D) Enzymatische Dephosphorylierung von BCIP durch die alkalische Phosphatase. (E) Das farblos vorliegende BCIP oxidiert nach der Dephosphorylierung durch die Alkaline Phosphatase in einer Reaktion mit NBT. Das gelb vorliegende NBT wird durch diese Reaktion reduziert. Oxidiertes BCIP und reduziertes NBT bilden jeweils ein blaues Präzipitat. Nachweis von mRNA-Transkripten durch Indigoblau. In Gegenwart der Alkalischen Phosphatase lassen sich mRNA-Transkripte sowohl auf Gewebedünnschnitten (F), als auch in Wholemount-Embryonen (G) nachweisen. Modifiziertes Schema nach Gilbert, 2003 und Wolenski, 2013.

2.2.12.1. *In situ* Hybridisierung an Gefrierschnitten

Die *in situ* Hybridisierung wurde nach einem geringfügig modifizierten Protokoll von Tabin, durchgeführt. Die auf RT angeglichenen Gefrierschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und zur Hybridisierung in eine geschlossene Färbewanne mit Waschpuffer gegeben. Zunächst wurde RNA-Antisense (Sonde) in Hybridisierungspuffer bei 70 °C für 10 Min. denaturiert und in einem Volumen von 120 µl pro Objektträger auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 68 °C inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Gefrierschnitte mit Deckgläsern abgedeckt. Am nächsten Tag vor der Posthybridisierung wurden die Deckgläser in einer Küvette in einem auf 68°C erwärmten Waschpuffer gelöst. Die Schnitte wurden weitere 60 Min. bei 68 °C in Waschpuffer inkubiert und im folgenden über 3 Schritte bei RT gewaschen. Der erste Waschschrift über 1 Stunde

erfolgt in einer Glasküvette in 1x MABT („maleic acid buffer containing Tween 20“, Maleinsäure mit Tween 20). Der zweite Waschschrift erfolgt mit 350 µl MABT in der Färbewanne. Im dritten Waschschrift werden durch das „Blocken“ für 1 Stunde mit 20% CHS („chicken serum“, Hühner Serum) (hitzeinaktiviert) in MABT unspezifische Bindungen des Antikörpers blockiert. Während dem Blocken wird die zweiprozentige Blocklösung mit dem anti-DIG-Antikörper hergestellt und für 60 Min. auf Eis inkubiert. Danach werden die Schnitte mit der anti-DIG-AK-Lösung über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht werden die Schnitte in einer Glasküvette mit MABT gewaschen (es ist darauf zu achten, dass die Deckgläschen abschwimmen, bevor die Schnitte für eine Stunde in 1x MABT bei RT inkubiert werden). Danach werden die Schnitte bei RT zweimal für 10 Min. in 350 µl AP-Puffer gewaschen. Für die Farbreaktion werden die Schnitte mit 120 µl einer Mischung aus 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP pro ml AP-Puffer benetzt. Um ein unspezifisches Präzipitat zu vermeiden, werden die Schnitte mit Deckgläsern abgedeckt und so vor Luftsauerstoff geschützt. Je nach verwendeter Sonde dauert die Färbereaktion von mehreren Stunden bis über Nacht. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgt mit PBS. Während der gesamten *in situ* Hybridisierung (ISH) ist darauf zu achten, dass die Schnitte nicht austrocknen. Abgesehen von der Hybridisierung ist die Färbewanne daher immer mit ausreichend Wasser zu befüllen. Während der Hybridisierung ist besonders darauf zu achten, dass keine RNasen in die verwendeten Lösungen (DEPC-H₂O) eingebracht werden, da diese zum Verdau der Sonden führen können. Im Anschluss an die Hybridisierung kann ein Zusatz von RNasen sogar sinnvoll sein, da auf diese Weise eine Hintergrundfärbung durch den Verdau ungebundener Sonden vermieden werden kann.

2.2.12.2. *In situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen („Wholemout“-ISH)

Für die „Wholemout“-ISH werden die Embryonen in 100% Methanol fixiert. Der Prähybridisierung ganzer Embryonen geht eine Rehydrierung der Embryonen in absteigender Alkoholreihe (75%, 50%, 25% Methanol in PBS und 0,1% Tween20 für ca. je fünf Min. bei RT) voraus. Das Wechseln der unterschiedlichen Methanolkonzentrationen erfolgt nach dem vollständigen Absinken der Embryonen. Die rehydrierten Embryonen werden bei RT zweimal für fünf Minute in einer PBS-Lösung mit 0,1% Tween20 und danach

für fünf Minuten in Prähybridisierungslösung gewaschen. Während dem Waschen in Prähybridisierungslösung ist der für die anschließende Prähybridisierung verwendete Prähybridisierungspuffer bei 68 °C zu erwärmen. Die Prähybridisierung von Embryonen bis zu E6 erfolgt in 2 ml Eppendorfgefäßen im Wasserbad. Im Anschluss an die einstündige Inkubation der Embryonen in der Prähybridisierungslösung werden 30 µl der Dig-gelabelten Sonde in einen ml Prähybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68 °C. Am Folgetag der Hybridisierung wird die Hybridisierungslösung sorgfältig abpipettiert (die Hybridisierungslösung kann weggefroren für weitere Hybridisierungsreaktionen aufbewahrt werden). Zur Entfernung nicht hybridisierter Sonden folgen vier Waschschriffe in Prähybridisierungslösung bei 68 °C. Die ersten zwei Waschschriffe erfolgen für 10 Min., die weiteren Waschschriffe für jeweils 30 Minuten. Der Prähybridisierungspuffer wird über das Waschen in MABT aus den Geweben entfernt. Der erste Waschschriff findet für 10 Min. bei 68 °C in einem Gemisch aus Prähybridisierungspuffer und 1x MABT im Verhältnis 1:1 statt. Es folgen drei Waschschriffe für 15 Min. in 1x MABT bei RT. Vor der Antikörperbindung ist das Gewebe eine Stunde mit 2% „Blocking-Reagent“ und zwei Stunden mit 2% „Blocking-Reagent“ und 20% hitzeinaktiviertem Serum (Schaf oder Huhn) bei RT zu behandeln. Die Antikörperbindung erfolgt mit dem anti-Dig-Antikörper (1:1000 in 1x MABT und 2% Blocking Reagent und 20% hitzeinaktiviertem Serum) bei 4 °C über Nacht. Am Folgetag schließt sich die Färbereaktion an. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen und eine unspezifische Färbung zu vermeiden, schließen sich drei Waschschriffe in 1x MABT bei RT auf dem Schüttler an. In kleinen Petrischalen werden die Embryonen dreimal für 10 Min. bei RT in NTMT-Puffer gewaschen. Die Färbereaktion findet für 30 Min. bis zu mehrere Stunden mit den Substraten NBT/BCIP (im Verhältnis 1:1 in NTMT-Puffer (10 µl/ml) im Dunkeln bei RT statt. Um ein Überfärben der Gewebe zu vermeiden, sollte die Färbereaktion in den ersten zwei Stunden alle zwanzig Minuten kontrolliert werden. Die Färbung wird durch dreimaliges Waschen in 1x PBS gestoppt. Durch das Nachfixieren in 4% Paraformaldehyd in PBS für zwei Stunden ist es möglich die Embryonen für längere Zeit bei 4°C zu lagern.

Der im Standardprotokoll empfohlene Proteinase K-Verdau wurde in dieser Studie ausgesetzt, um die Gewebe der frühen Embryonalstadien zu schonen.

2.2.13. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist die meist benutzte Färbemethode in der Histologie. Hämatoxylin, ein Farbstoff, der aus dem mexikanischen Blauholzbaum (*Heamatoylan Camoechiamun*) stammt, färbt in seiner oxidierten Form (Hämatein) die Zellkerne blau. Eosin, ein gelbroter Xanthinfarbstoff färbt das Zytoplasma und die Zellfasern pink. Die in dieser Arbeit durchgeführten HE-Färbungen wurden nur an Paraffinschnitten durchgeführt. Die HE-Färbung beginnt mit der Deparaffinisierung der Gewebedünnschnitte in Xylol. Hierzu werden die Schnitte zweimal jeweils eine Min. in einer Küvette gefüllt mit Xylol gewaschen. Um das Xylol zu entfernen, werden die Schnitte für jeweils eine Minute in einer absteigenden Ethanolreihe gewaschen (100%, 95%, 90%, 70%). Im Anschluss an die Waschschrte in Ethanol werden die Gewebeschnitte für 10 Min. bei 25°C in Hämatoxylin gebadet (hierzu wurden die Schnitte in der Küvette mit Färbelösung lediglich in ein weiteres Gefäß mit warmem Wasser überführt). Anschließend werden die Schnitte zum „Bläuen“ für eine bis zu fünf Stunden in fließendem Wasser im Wasserbad gewaschen. Nach dem „Bläuen“ werden die Schnitte einige Sekunde in Ethanol getaucht. An den Waschschrte in Ethanol schließt sich die zwei bis fünf Min. dauernde Färbung in Eosin-Lösung an. Die mit Eosin gefärbten Schnitte sind in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 95%, 100%) zu waschen. Während die Schnitte zum Waschen nur in den 70% und 90% Ethanol eingetaucht werden, sind sie im weiteren Verlauf für eine Min. in Ethanol zu inkubieren. Das zweimalige Waschen in 100% Ethanol für zwei Min. dient der vollständigen Dehydrierung des Wassers. Dem Waschen in Ethanol folgen drei Waschschrte in Xylol zu jeweils zwei Min. und abschließend einer Min.. Die gefärbten Schnitte werden in einer Mischung aus Entellan und Xylol (100 µl pro Schnitt) eingedeckelt.

2.2.14. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient einem spezifischen Nachweis von Protein im Gewebe. Der Proteinnachweis erfolgt durch die Bindung eines Primärantikörpers an dessen Zielprotein. Die mit dem Zielprotein gebundenen Primärantikörper werden im folgenden mit einem Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, nachgewiesen. Die

Spezifität der in dieser Arbeit genutzten Antikörper wurde durch die Firmen, von denen diese Antikörper bezogen wurden, charakterisiert.

Für die Immunhistochemie wurden in dieser Arbeit Gefrierschnitte und Organkulturen verwendet.

Die zuerst auf einer Heizplatte bei 37 °C getrockneten Gefrierschnitte werden bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten mit TBSA inkubiert, um die unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Auf das Blocken folgt die Zugabe des in TBSA gelösten Primärantikörpers. Gemeinsam mit dem Primärantikörper erfolgt eine Inkubation für mehrere Stunden oder über Nacht bei RT (je nach Antikörper wurde das Standardprotokoll bezüglich der Inkubationszeit modifiziert). Zur Vermeidung einer unspezifischen Färbung schließen sich an die Inkubation des Primärantikörpers drei Waschschrte für 10 Min. mit 1x PBS an. Die Bindung des mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgt nach einstündiger Inkubation bei RT. Die verwendeten Sekundärantikörper wurden in TBSA 1:100 oder 1:200 verdünnt. Die Reste des ungebundenen Zweitantikörpers werden durch zweimaliges Waschen für 10 Min. in PBS entfernt. Um spezifische Antikörperbindungen innerhalb der Gewebeschnitte nachvollziehen zu können, werden die Zellkerne der gesamten Gewebeschnitte für zwei bis 5 Min. Mit 4,6-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) angefärbt. Nach der Färbung mit DAPI schließt sich ein weiterer Waschschrte in destilliertem Wasser für 10 Min. an. Die gefärbten Schnitte trocknen bei 37 °C auf der Heizplatte und werden in Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckelt. Während der gesamten Antikörperfärbung ist darauf zu achten, dass die Schnitte nicht austrocknen (Färbewanne wird mit H₂O gefüllt). Ab der Kopplung des Primärantikörpers mit dem fluoreszent markierten Sekundärantikörper, ist zur Aufrechterhaltung der Fluoreszenz unter Lichtabschluss zu arbeiten, auf diese Weise wird ein Ausbleichen verhindert.

Tabelle 3: Konzentrationen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Primär-AK	Verdünnung	Sekundär-AK	Verdünnung
MITF	1:1500	Anti-Hase, Alexa Fluor 488 /Cy3	1:200
MMP115	1:50	Anti-Maus, γ 3/Cy5	1:200
RPE65	1:500	Anti-Maus, γ 3/Cy5	1:200
P-SMAD 1/5/8	1:1000	Anti-Hase, Alexa Fluor 488 /Cy3	1:200
β -Catenin	1:500	Anti-Maus, Cy3/Cy5	1:200
PAX7	1:1000	Anti-Maus, Cy3/Cy5	1:200

2.2.15. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend deren Größe. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller bewegt es sich durch die Agarose. Die Zuordnung der DNA-Fragmente erfolgt durch einen kbp-Marker, der neben den einzelnen DNA-Proben mit auf das Agarose-Gel aufgetragen wird. Die 0,7-1,5% in TAE-Puffer angesetzte Agarose wird in der Mikrowelle so lange aufgeköcht, bis diese vollständig gelöst ist. Der auf 60 °C abgekühlten Lösung wird zur Visualisierung der in Banden aufgetrennten DNA-Fragmente 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Um die auf das Gel aufzutragenden Proben besser applizieren zu können, wurden diese in einem Volumen von 1/10 in 10x Auftragspuffer gelöst. Die an das Gel angelegte Spannung beträgt 80-120V und erfolgt für 30 Minuten bei einer Übersichtung des Gels mit 1x TAE-Puffer. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgt durch deren Bindung mit dem zugegebenen Ethidiumbromid unter ultraviolettem (UV)-Licht.

3. Ergebnisse

Vorgehensweise:

Um herauszufinden, ob das Ektoderm und Signale aus diesem einen Einfluss auf die frühe Spezifizierung der RPE- und NR-Domäne im Augenvesikel haben, wurden in dieser Studie Wildtyp-Expressionsstudien zu HH8/9/10 durchgeführt. Nach funktionellen Studien *in vivo* und *in vitro* wurden die behandelten Embryonen nach 24 Std. und 72 Std. fixiert. Während nach 24 Std. frühe Spezifizierungsmarker analysiert wurden, wurde nach 72 Std. der Differenzierungsmarker *Mmp115* oder die Pigmentierung analysiert.

3.1. Die frühe Spezifizierung der RPE-Domäne vollzieht sich unterhalb des BMP-exprimierenden Oberflächenektoderms

Erste *Mitf*-Transkripte konnten im distalen optischen Vesikel des Hühnerembryos unterhalb des BMP exprimierenden Oberflächenektoderms im Huhn gegen Stadium HH9 (Müller, Rohrer et al. 2007) gezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte kein MITF-Protein im Augenvesikel nachgewiesen werden (Abb. 17: A-C). Im Stadium HH10 wird das MITF-Protein wenige Stunden nach der Induktion der *Mitf*-Expression (Müller et al., 2007) im distalen Bereich des Augenvesikels gebildet (Abb. 17: D-F).

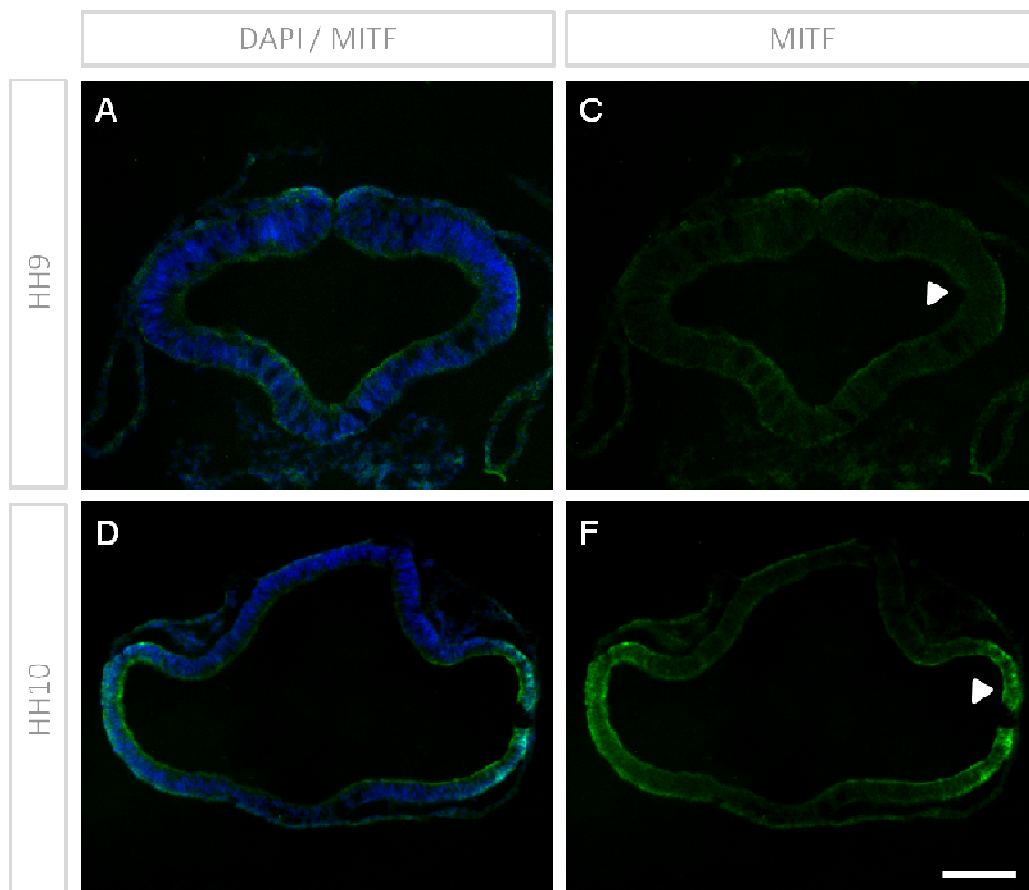


Abbildung 17: Die frühe MITF-Lokalisation im Hühnerembryo gegen Stadium HH9/10.

A-F: Immunfärbung mit dem für die frühe RPE-Domäne spezifischen Antikörper MITF (Wildtyp). A-C: Es kann keine MITF-Lokalisation im Bereich der Augenvesikel (Dreieck) im Stadium HH9 gezeigt werden. D-F: Im Stadium HH10 ist MITF deutlich im distalen Augenvesikel (Dreieck) vorhanden. Der Maßstabsbalken zeigt 100 µm.

3.2. Phosphorylierte SMAD-Proteine, die eine Funktion während dem aktivierten BMP Signalweg besitzen, sind zum Zeitpunkt der RPE-Spezifizierung im Augenvesikel lokalisiert

Bmps werden im gesamten Oberflächenektoderm über dem distalen Augenvesikel exprimiert (Müller, Rohrer et al. 2007). Das *Bmp*-exprimierende Oberflächenektoderm könnte somit die RPE-Entwicklung im distalen Augenvesikel induzieren. Die Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren bewirkt die Phosphorylierung (p) von SMAD1/5 oder 8 und könnte somit auf einen aktivierten BMP-Signalweg hinweisen. Um eine mögliche Funktion der BMPs auf die frühe Bildung der RPE-Domäne zu untersuchen, wurde in dieser Studie die Verteilung von pSMAD-Proteinen im distalen Augenvesikel im Stadium HH10-11 des Hühnerembryos untersucht (Abb. 18). Im Stadium HH10 konnte eine starke nukleäre pSMAD1/5/8-Färbung im distalen Oberflächenektoderm des distalen Augenvesikels nachgewiesen werden (Abb. 18A). Einige Stunden später (HH11) erscheint eine stärkere pSMAD-Färbung im dorsalen Bereich des Augenvesikels (Abb. 18: B, C).

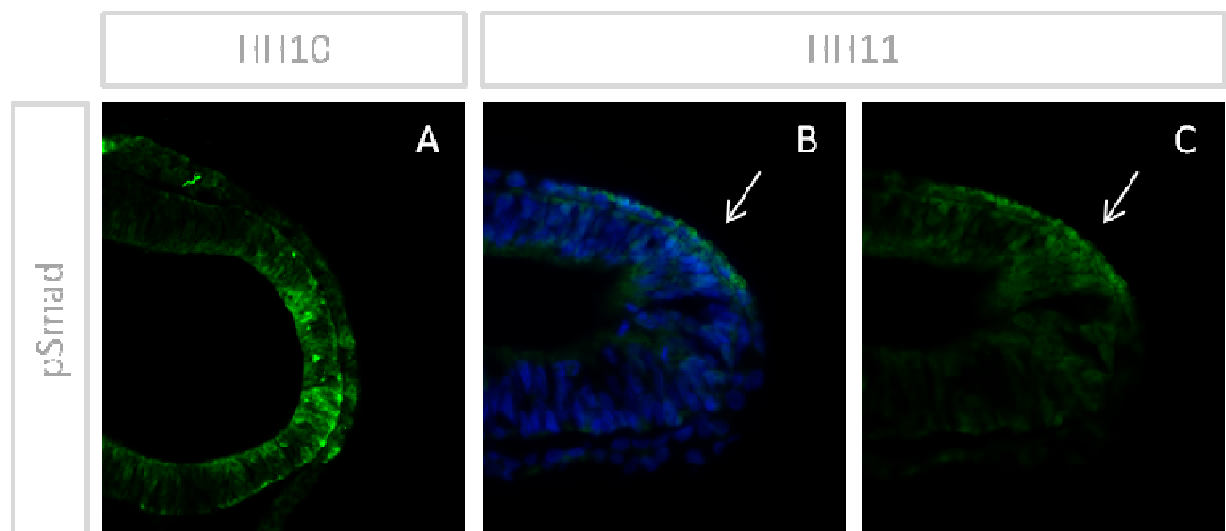


Abbildung 18: Die pSMAD1/5/8-Lokalisation verschiebt sich während der Entwicklung des Augenvesikels im Neuroepithel und Oberflächenektoderm von distal nach dorsal.

(A) pSMAD1/5/8 ist gegen Stadium HH10 im gesamten distalen Augenvesikel und Oberflächenektoderm exprimiert. (B, C) Dorsale Lokalisation von pSMAD1/5/8 im Oberflächenektoderm und Neuroepithel im Stadium HH11.

3.3 Das Oberflächenektoderm besitzt eine essenzielle Funktion bei der frühen Augenentwicklung

Um eine mögliche Funktion des Oberflächenektoderms auf die frühe RPE-Spezifizierung im Hühnerembryo zu untersuchen, wurde das Oberflächenektoderm in den frühen Stadien der Augenentwicklung (HH8-10) mit Hilfe von Nil Blau Sulfat entfernt (Abb. 19). An Schnitten behandelter Embryonen konnte nachgewiesen werden, dass das Oberflächenektoderm erfolgreich entfernt wurde (Abb. 19: B). In Folge der Entfernung des Oberflächenektoderms konnte auf der operierten Seite des manipulierten Augenvesikels nach 24 Stunden keine Linsenentwicklung und Augenbecherbildung beobachtet werden (n=12/13, Abb. 19: C). Stattdessen zeigt sich zwischen den Entwicklungsstadien HH13 und HH14 eine Regeneration des zuvor entfernten Oberflächenektoderms.

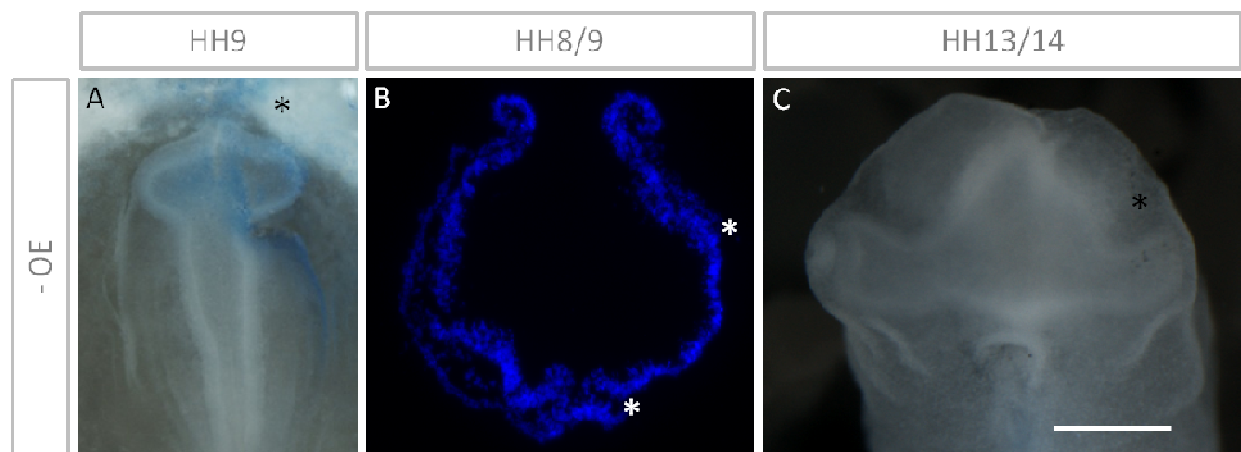


Abbildung 19: Das Oberflächenektoderm im Huhn wird für die Entwicklung des Augenbechers und der Linse benötigt.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms im Stadium HH9 am rechten optischen Vesikel (Sternchen). B: (DAPI/blau) Querschnitt durch den Bereich der Augenvesikel (HH8) nach Entfernung des OE (Sterne = Bereich des entfernten Oberflächenektoderms). C: Einen Tag nach der Manipulation zeigt der Embryo auf der behandelten Seite (Stern) ein Ausbleiben der Augenbecherbildung und Linsenentwicklung. Der Maßstabsbalken entspricht in C 250 μm , in B 177 μm und in A = 80 μm .

3.4. Die Entfernung des Oberflächenektoderms führt im Augenvesikel zum Verlust der MITF und pSMAD-Proteine

Um die Funktion der im Oberflächenektoderm exprimierten BMPs herauszufinden, wurde die MITF und pSMAD-Proteinlokalisierung nach der Entfernung des Oberflächenektoderms analysiert (Abb. 20). Obwohl einen Tag nach der Entfernung des Oberflächenektoderms mesenchymale Zellen im dorsalen Bereich über dem Augenvesikel lokalisiert sind (Abb. 29), wurden die Proteine MITF und pSMAD herunterreguliert (n=12/13, Abb. 20).

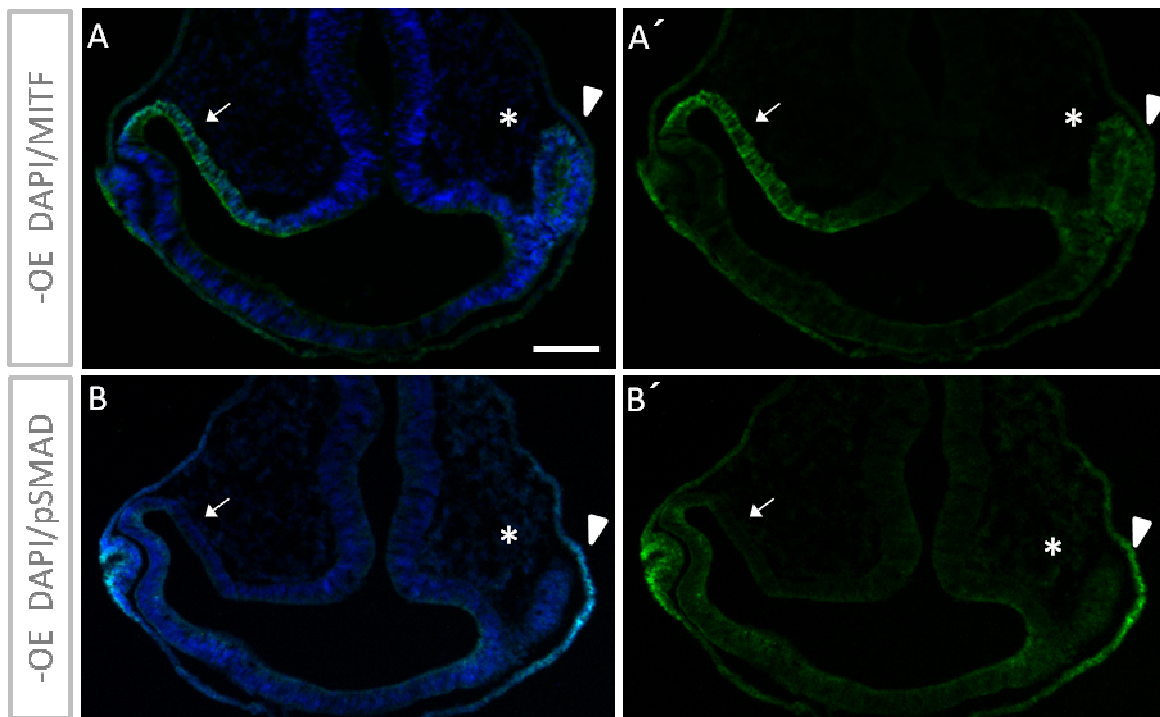


Abbildung 20: Das *Bmp*-exprimierende Oberflächenektoderm scheint die MITF-Lokalisation im Augenvesikel zu regulieren.

A-B': Die Entfernung des Oberflächenektoderms (OE) führt zu einer reduzierten MITF und pSMAD (pSMAD1/5/8) Lokalisation in den Geweben im Bereich des Augenvesikels. A-A': Im Gegensatz zur unbehandelten Seite (Pfeil) ist die MITF-Lokalisation auf der behandelten Seite (Dreieck) nach der Entfernung des Oberflächenektoderms stark reduziert. B-B': Parallelschnitt von A. Nach der Entfernung des OEs ist pSMAD auf der behandelten Seite (Dreieck) im Vergleich zur unbehandelten Seite (Pfeil) stark reduziert. A-B': Das im Stadium HH8/9 entfernte OE oberhalb des behandelten Augenvesikels ist im Stadium HH14 vollständig regeneriert (Dreieck). Auf der behandelten Seite kann im Vergleich zur unbehandelten Seite keine Bildung der Linse oder des Augenbechers festgestellt werden. Einen Tag nach der Behandlung sind im dorsalen Bereich mesenchymale Zellen lokalisiert (Sternchen). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

3.5. BMPs können MITF und pSMAD-Proteine im Augenvesikel in Folge der Oberflächenektodermentfernung stabilisieren

In Übereinstimmung mit den „loss of function“ Experimenten, bei denen in Folge der Oberflächenektodermentfernung ein Verlust der MITF-Lokalisation im distalen Augenvesikel festgestellt werden konnte, zeigen „rescue-Experimente“ mittels „bead“-Applikation, dass BMPs (BMP7) eine MITF- und pSMAD-Proteinlokalisierung in 47% aller Operationen (n=9/19) aufrecht erhalten können (Abb. 21: A-F'). Interessanterweise entwickeln die zu früheren Stadien behandelten Embryonen (HH8) trotz der durch BMP7 aufrecht erhaltenen Proteinlokalisierung eine unterdrückte Augenbecherbildung. Die gegen Stadium HH10 durchgeführte Operation (Abb. 22: A, siehe „bead“) weist zum Zeitpunkt der Fixierung (HH13) eine ausbleibende Linsen- und Augenbecherbildung im behandelten Augenvesikel (n=4/7, Abb. 22: B, Sternchen) auf. Durch „rescue“-Experimente mit BMP7 konnte trotz der ausbleibenden Bildung des Augenbechers eine Aufrechterhaltung der MITF- und pSMAD-Protein-Lokalisation festgestellt werden.

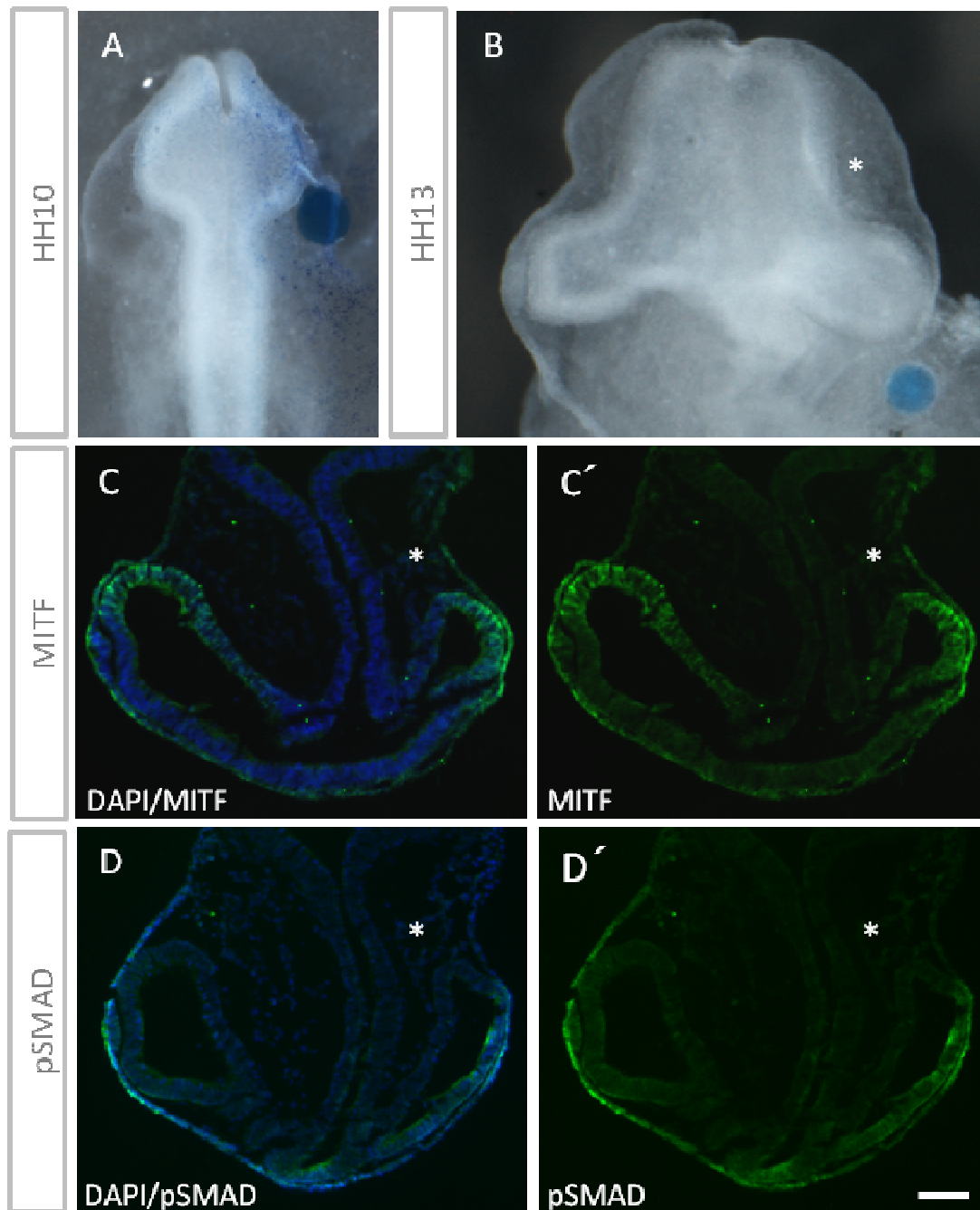


Abbildung 21: BMP7 erhält die MITF-Lokalisation nach Entfernung des Oberflächenektoderms im distalen optischen Vesikel aufrecht.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und temporäre BMP7 Applikation im distalen Bereich neben dem optischen Vesikel (HH8). B: Im Vergleich zur unbehandelten Seite ist die Bildung der Linse und des Augenbechers auf der behandelten Seite (s. Stern) unterbrochen. C, C': Auf der behandelten Seite kann in Folge der BMP7 Applikation MITF aufrecht erhalten werden (Stern). D, D': nach erfolgter Ektodermentfernung ist pSMAD in Folge einer BMP7 Applikation distal im OV lokalisiert.

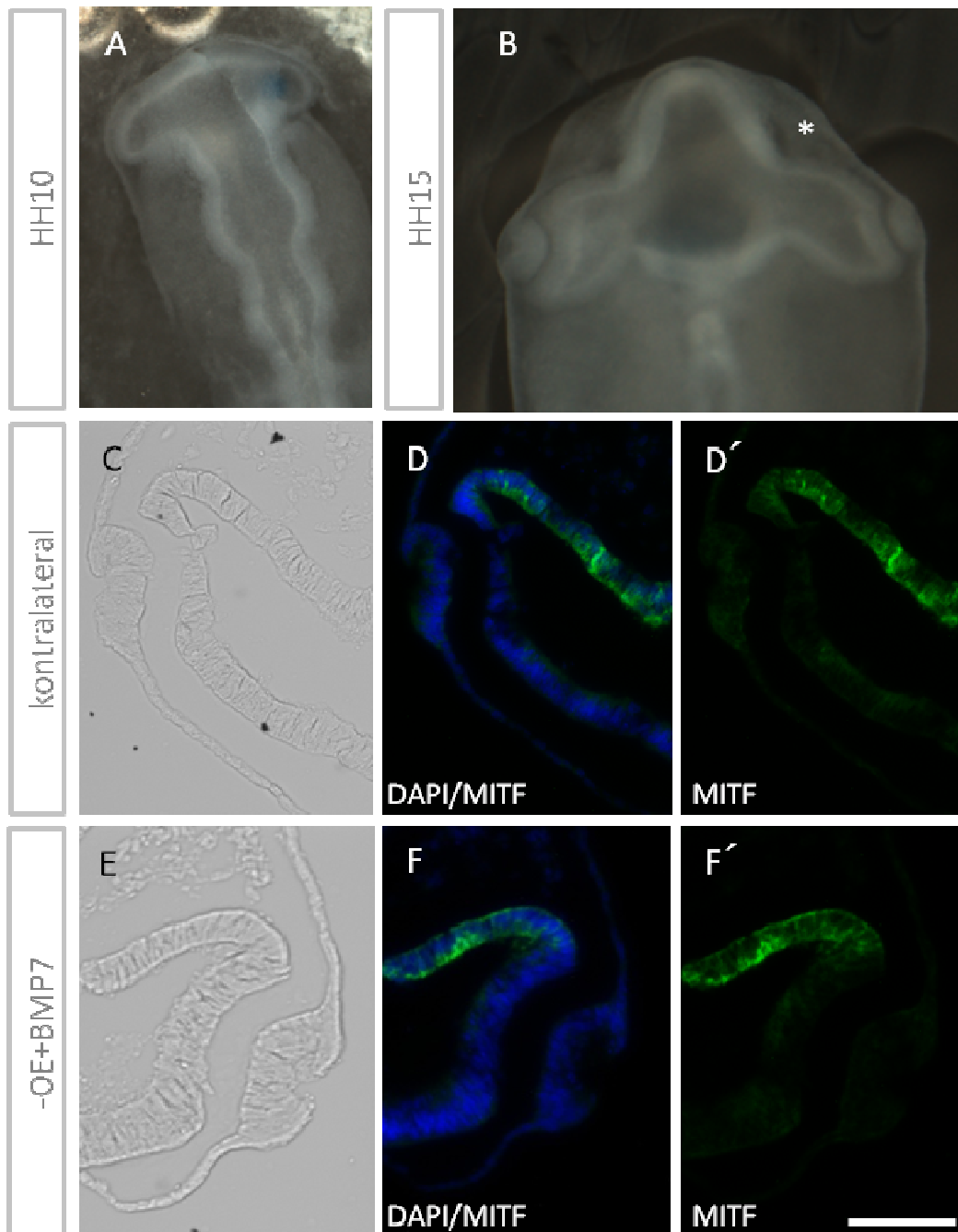


Abbildung 22: In Abwesenheit des Oberflächenektoderms kann BMP7 die MITF-Lokalisation und die Augenbecherbildung aufrecht erhalten.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und BMP7 Applikation im Stadium HH10. B: Embryo zum Zeitpunkt der Fixierung 24 Stunden nach der Operation. C-F': (DAPI/blau) In Abwesenheit des Oberflächenektoderms kann BMP7 die MITF-Lokalisation (grün) und die Augenbecherbildung (Stern) aufrecht erhalten. Der Maßstabsbalken in D' entspricht 100 μ m.

3.6. Die Mitglieder der WNT-Familie besitzen eine essenzielle Funktion während der RPE-Spezifizierung und der Verschiebung der RPE-Domäne in die dorsale Region des Augenvesikels

Die Lokalisation der pSMADs verschiebt sich zwischen HH10 und HH11 in die dorsale Region des Augenvesikels (Abb. 18). Da *Bmp4* und *Bmp7*-Transkripte zu diesem Zeitpunkt immer noch im gesamten Augenvesikel nachgewiesen werden können (Crossley, Martinez et al. 2001; Müller, Rohrer et al. 2007), ist davon auszugehen, dass noch ein weiterer Faktor aus dem Oberflächenektoderm an der frühen Spezifizierung des RPEs und an dessen späterer Begrenzung auf die dorsale Region des Augenvesikels beteiligt ist. Da WNT-Signale während der Embryonalentwicklung ein dorsales Zellschicksaal vermitteln können (Klaus and Birchmeier 2008), wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster verschiedener Mitglieder der WNT-Familie wie *Wnt2b*, *Wnt3a* und *Wnt8b* während der frühen Entwicklung des Hühnerauges untersucht. *Wnt3a* und *Wnt8b* scheinen gegen Stadium HH10 nicht im Bereich des optischen Vesikels exprimiert zu sein (Van Raay and Vetter 2004; Rossi, Siwiec et al. 2007; Garcia-Lopez, Pombero et al. 2009; Quinlan, Graf et al. 2009). In dieser Arbeit konnten lediglich *Wnt2b*-Transkripte zum Zeitpunkt der RPE-Spezifizierung im dorsalen Oberflächenektoderm und im dorsalen Augenvesikel nachgewiesen werden (Abb. 23: A-G). Bereits gegen Stadium HH9 konnten *Wnt2b*-Transkripte im dorsalen und im distalen Bereich des Oberflächenektoderms über dem Augenvesikel festgestellt werden (Abb. 23: E). Schwächer als im Oberflächenektoderm konnten zu dieser Zeit auch im dorsalen Neuroepithel des Prosencephalons *Wnt2b*-Transkripte gezeigt werden. In den Stadien HH10/11 breitete sich die *Wnt2b*-Expression zunehmend im Neuroepithel aus (sowohl im Prosencephalon als auch im Augenvesikel), können zu keiner Zeit *Wnt2b*-Transkripte im ventralen Bereich des Oberflächenektoderms oder Neuroepithels des Augenvesikels gezeigt werden (Abb. 23: C-G). Zusammengefasst lassen die Expressionsmuster von *Wnt2b* darauf schließen, dass der *Wnt2b* Signalweg eine Funktion während der frühen Augenentwicklung besitzt.

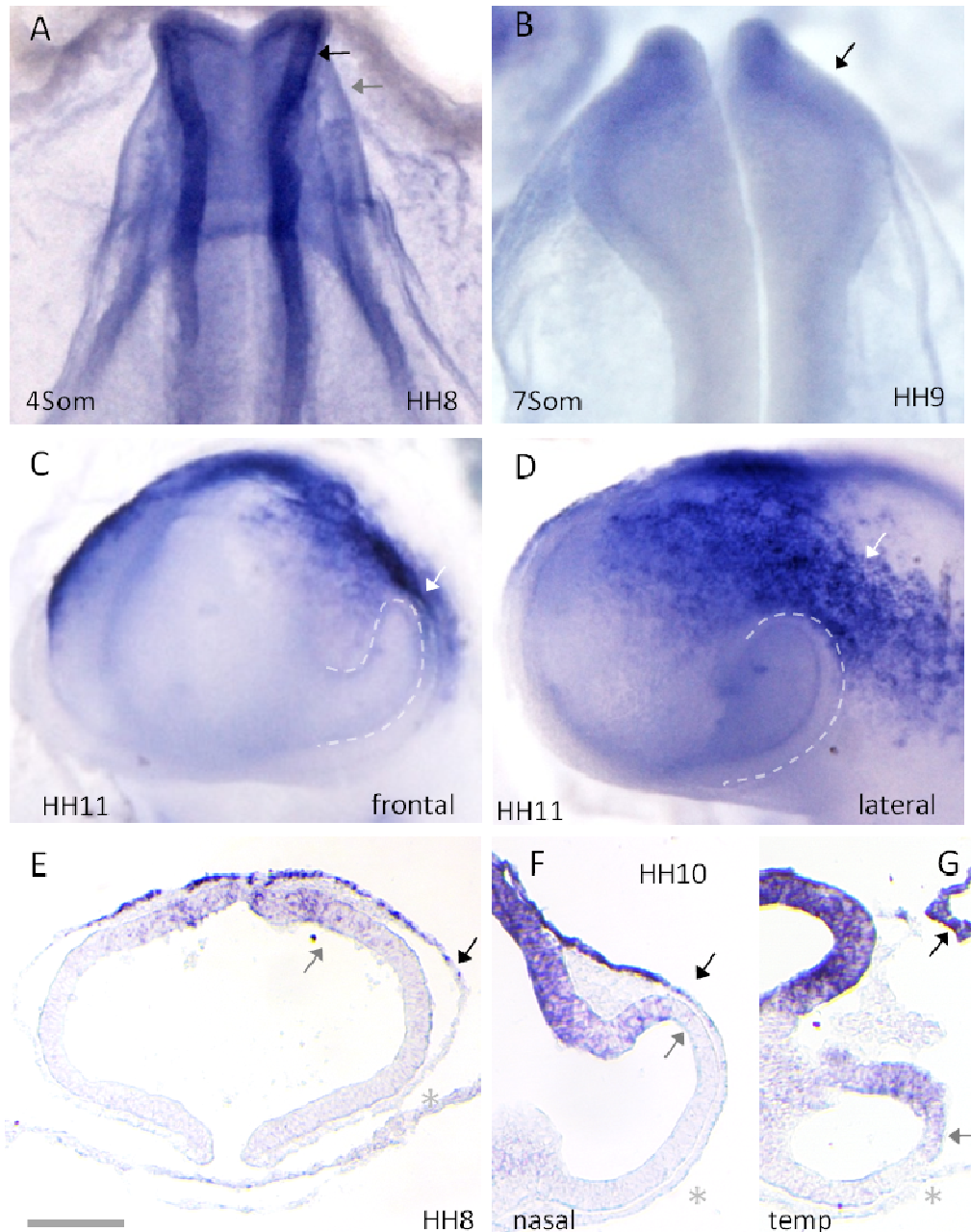


Abbildung 23: Die *Wnt2b*-Expression im dorsalen Neuroektoderm und Oberflächenektoderm während der frühen Augenentwicklung im Huhn.

A-G: *Wnt2b*-Expression während der frühen Entwicklung der Augenvesikel im Wildtyp des Hühnerembryos (HH8-HH11). A: *Wnt2b* ist stark im Bereich der distalen Neuralplatte (schwarzer Pfeil) und im umliegenden Ektoderm (grauer Pfeil) exprimiert (HH8, 4 Somiten). B: Zu HH9 ist die *Wnt2b*-Expression im Bereich des anterioren Neuroporus (Aufsicht = dorsal) lokalisiert. C-D: Gegen Stadium HH11 befinden sich *Wnt2b*-Transkripte im Bereich des dorsalen OEs (Pfeil), welches das Augenvesikel (gestrichelte Linie) dorsal bedeckt (C = frontal; D = lateral). E-G: Die *Wnt2b*-Expression im Stadium HH9 (E), HH10 (F, nasal) und HH10 (G, temporal). Die *Wnt2b*-Expression ist zu den frühen Stadien des Augenvesikels auf das dorsale OE (schwarzer Pfeil) und das dorsale Neuroepithel (grauer Pfeil) begrenzt. Es können keine *Wnt2b*-Transkripte im ventralen OE und im ventralen Augenvesikel (Stern) nachgewiesen werden. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

3.7. Während der frühen Augenentwicklung ist eine nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion von Bedeutung.

Bis vor kurzem nahm man an, dass *Wnt2b* nur den kanonischen WNT-Signalweg (WNT/ β -Catenin Signalweg) aktiviert. Während es im aktivierten kanonischen WNT-Signalweg durch die Hemmung der GSK3- β zur Anhäufung von β -Catenin im Zellkern kommt, führt die aktive Form der GSK3- β im nicht-kanonischen oder inaktiven WNT-Signalweg zur Degradation von β -Catenin. Interessanterweise konnte in dieser Studie trotz des Nachweises von *Wnt2b*-Transkripten im Oberflächenektoderm und Neuroepithel des Augenvesikels im Stadium HH10 kein nukleäres β -Catenin in den Zellkernen des Neuroepithels nachgewiesen werden (Abb. 24). Dies weist auf eine mögliche Funktion des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs im Neuroepithel des frühen Augenvesikels in den Stadien HH10/11 (Daten zu HH11 sind in dieser Arbeit nicht dargestellt) hin. Im Kontrast zum Neuroepithel scheint nukleäres β -Catenin in den frühen Stadien zu HH10/11 nur im Oberflächenektoderm über dem Augenvesikel lokalisiert. Zu HH12/13 kann dieses auch im Neuroepithel des Augenvesikels unterhalb des Oberflächenektoderms nachgewiesen werden (Abb. 28: C'').

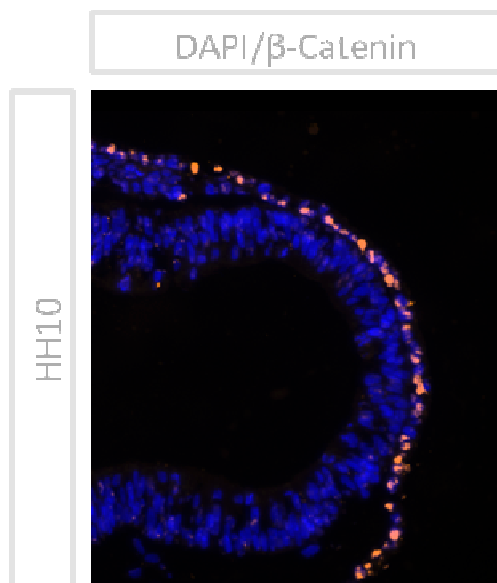


Abbildung 24: Der WNT/ β -Catenin Signalweg ist im Neuroepithel des frühen Augenvesikels nicht aktiv.

Nukleäres β -Catenin (orange) kann im Stadium HH10 nur im Oberflächenektoderm nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Hinweis kürzlich publizierter Studien, dass *Wnt2b* ähnlich wie *Wnt3a* ein Agonist des kanonischen wie auch nicht-kanonischen WNT-Signalwegs (Abdul Ghani et al., 2011; Gessert und Kühl, 2010; Qui et al., 2011; Qui et al., 2013) (Saito, Tampe et al. 2015) ist.

3.8. In Folge der Oberflächenektodermentfernung reichen WNT-Signale aus, um die RPE-Spezifizierung und Bildung des Augenbechers aufrecht zu erhalten

Um zu untersuchen, ob WNT-Signale aus dem Oberflächenektoderm tatsächlich an der Spezifizierung der RPE-Domäne beteiligt sind, wurde nach der Entfernung des Oberflächenektoderms gegen Stadium HH9 bis HH10 der WNT-Signalweg durch die Applikation von in WNT3a inkubierten „beads“ in das optische Vesikel des Hühnerembryos aktiviert. Im Gegensatz zu WNT2b ist das WNT3a-Protein kommerziell verfügbar. In 50% (n=8/16) der Fälle wurde eine Aufrechterhaltung der MITF-Protein-Akkumulation im dorsalen Augenvesikel gezeigt (Abb. 25: C). Nach der Entfernung des Oberflächenektoderms war WNT3a ausreichend, um eine MITF-Proteinlokalisation aufrecht zu erhalten (Abb. 25, 26), und um die Bildung des Augenbechers und der Linse aufrecht zu erhalten (80% n=10, Abb. 26).

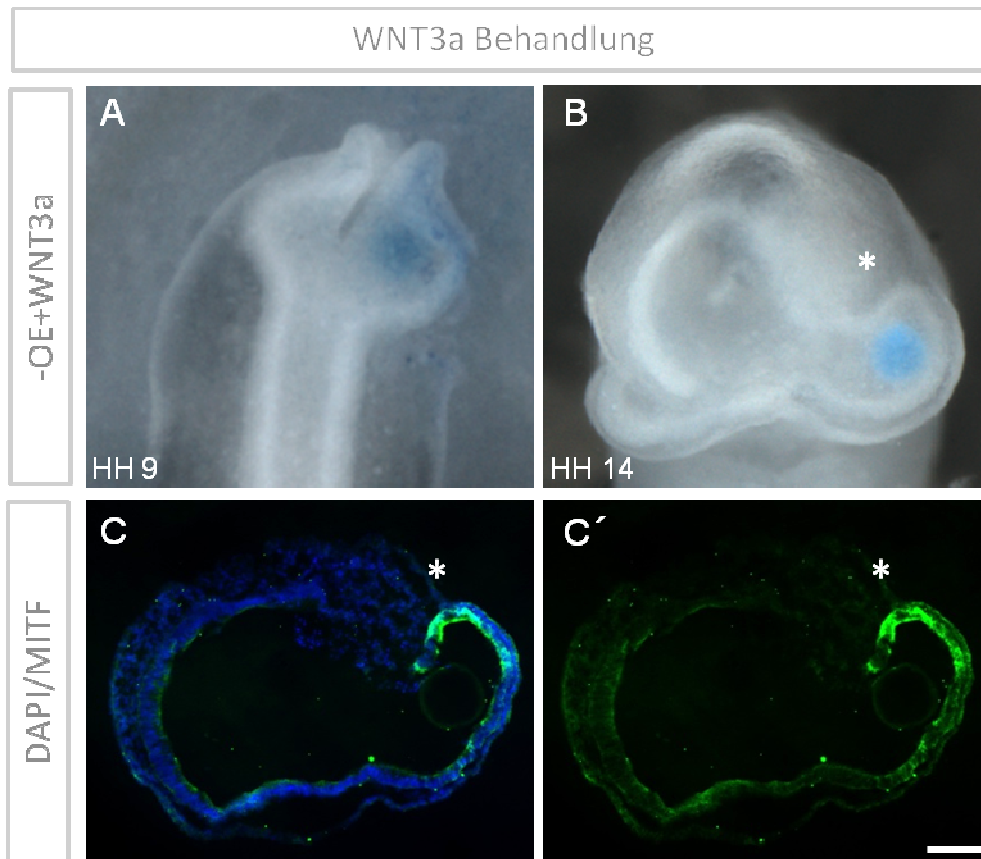


Abbildung 25: WNT3a kann die Funktion des Oberflächenektoderms ersetzen und die MITF-Lokalisation aufrecht erhalten.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und WNT3a-Protein Applikation im Stadium HH9. B: Embryo zum Zeitpunkt der Fixierung 24 Stunden nach der Operation. C, C': Immunfärbung auf Gefrierschnitten des Embryos im Stadium HH14 (MITF/grün), (DAPI/blau). In Abwesenheit des Oberflächenektoderms erhält WNT3a die MITF-Lokalisation (Stern) aufrecht. Aufgrund der Schnittebene ist das unbehandelte Auge nicht dargestellt (vergleiche hierzu die WT-Expression in Abb. 27: C'). Der Maßstabsbalken in A-C' entspricht 100 µm.

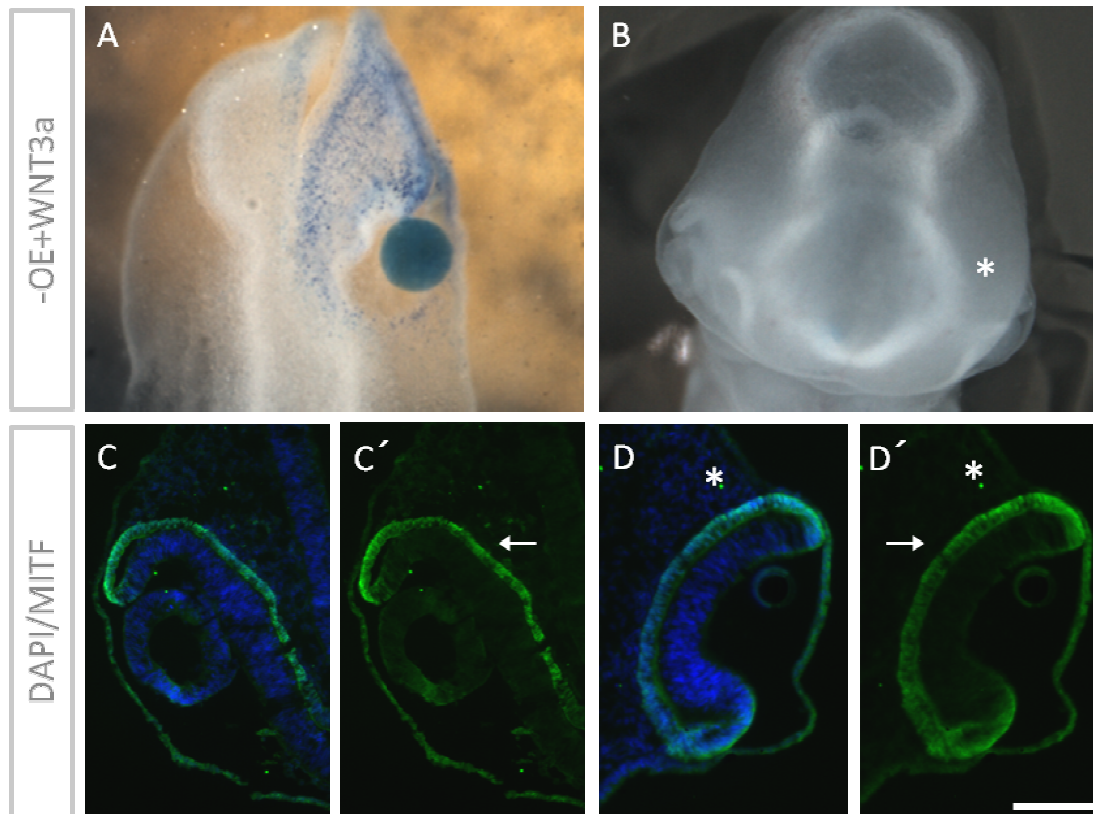


Abbildung 26: WNT3a kann die Funktion des Oberflächenektoderms ersetzen und die Augenbecherbildung aufrecht erhalten.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und WNT3a-Proteinapplikation. B: Embryo zum Zeitpunkt der Fixierung 24 Stunden nach der Operation. C-D': (DAPI/blau) In Abwesenheit des Oberflächenektoderms kann WNT3a (Stern) die MITF-Lokalisation (Pfeil, grün) und die Augenbecherbildung aufrecht erhalten. Der Maßstabsbalken in D' entspricht 100 µm.

3.9. Die Hemmung der GSK3-β reicht aus, um die RPE-Domäne in Folge der Oberflächenektodermentfernung aufrecht zu erhalten.

Zusätzlich zu den „rescue“-Experimenten mit WNT3a wurde nach der Entfernung des Oberflächenektoderms (HH9/10) der GSK3-β Inhibitor AP appliziert. In 75% (n=3/4) aller Fälle konnte durch die Applikation von AP eine Aufrechterhaltung der MITF-Protein-Akkumulation im Augenvesikel gezeigt werden (Abb. 27: C). Nach der Entfernung des Oberflächenektoderms war der durch AP aktivierte kanonische WNT-Signalweg ausreichend, um eine MITF-Lokalisation aufrecht zu erhalten (Abb. 27). Zusammengefasst waren WNT-Signale, wie auch die Inhibition der GSK3-β ausreichend, um die neuroepithelialen Zellen des

Augenvesikels nach der Entfernung des Oberflächenektoderms in Richtung eines RPE ähnlichen Zellschicksals zu bewegen.

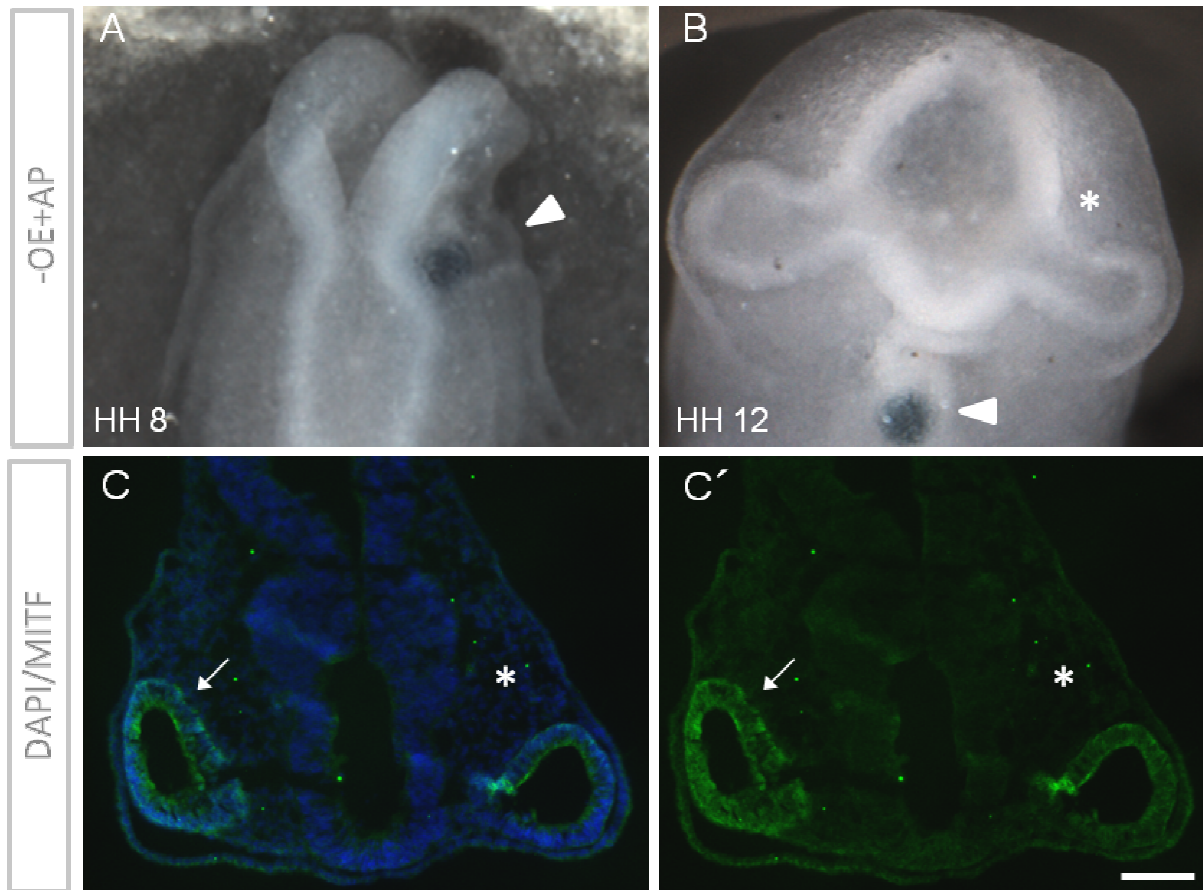


Abbildung 27: AP erhält die MITF-Lokalisation im dorsalen Augenvesikel nach Entfernung des Oberflächenektoderms nur schwach aufrecht. In Gegenwart des Oberflächenektoderms führt AP zu einer hoch regulierten MITF-Lokalisation.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und Alsterpaullone- (AP) Applikation (Dreieck) im Stadium HH8. B: Das mit AP behandelte Augenvesikel (Stern) ist 24 Stunden nach der Behandlung deutlich kleiner als das kontralaterale Augenvesikel (Pfeil). Der in Alsterpaullone inkubierte „bead“ ist im ventralen Vorderhirn lokalisiert (Dreieck). C, C': In Anwesenheit des Oberflächenektoderms (unbehandelte Seite) führt die Freisetzung von AP zur Induktion der MITF-Proteinlokalisierung im gesamten Augenvesikel (Pfeil). Auf der behandelten Seite kann nur eine schwache MITF-Lokalisation festgestellt werden. Der Maßstabsbalken in C' entspricht 100 µm, in A 128 µm und in B 115 µm.

Im Kontrollexperiment konnte nach der Applikation von Dimethylsulfoxyd (DMSO)-„beads“ gezeigt werden, dass das zuvor beschriebene Resultat durch den bei der „bead“-Applikation applizierten Stoff Alsterpaullone und nicht durch das zur Lösung von Alsterpaullone benutzte

DMSO hervorgerufen wurde. Die DMSO-„bead“ Applikation nach vorheriger Oberflächenektodermentfernung (Abb. 28) zeigt die Entwicklung eines Phänotyps analog der Oberflächenektodermentfernung über dem Augenvesikel ohne anschließende „bead“-Applikation (beschriebene Operation in Abb. 11, 12). Der nach der Oberflächenektodermentfernung (Abb. 28: A) weiter kultivierte Embryo (Abb. 28: B) zeigte einen Tag nach der Operation einen deutlich weniger entwickelten Augenvesikel. Die durchgeführte Ablation des Oberflächenektoderms führte auf der behandelten Seite zum vollständigen Verlust der MITF-Lokalisation (Abb. 28: D, D'). Die Lokalisation von nukleärem β -Catenin war hingegen unverändert (Abb. 28: D, D''). Auch die Kontroll-Experimente mit PBS (Abb. 29) zeigten keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der während der RPE-Spezifizierung essenziellen Proteinaktivität. Nach der Oberflächenektodermentfernung (Abb. 29: A) zeigte sich einen Tag nach der Operation (Abb. 29: B) auf der behandelten Seite des Embryos wie bei den DMSO-Experimenten ein im Vergleich zur kontralateralen Seite des Embryos stark in der Entwicklung zurückgebliebener Augenvesikel. Nach der Oberflächenektodermentfernung war die pSMAD-Lokalisation im behandelten Auge (Abb. 29: D, D') trotz der PBS-„bead“ Applikation im Vergleich zur unbehandelten Seite (Abb. 29: C, C') stark herunterreguliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in den Kontrollexperimenten mesenchymale Zellen, selbst wenn sie das gesamte Augenvesikel umgeben (Abb. 29 D'') keinen Einfluss auf pSMAD während der RPE-Spezifizierung besitzen. Zusammengefasst belegen die Kontrollexperimente, dass DMSO und PBS keine Wirkung auf die normale Entwicklung des Augenvesikels haben.

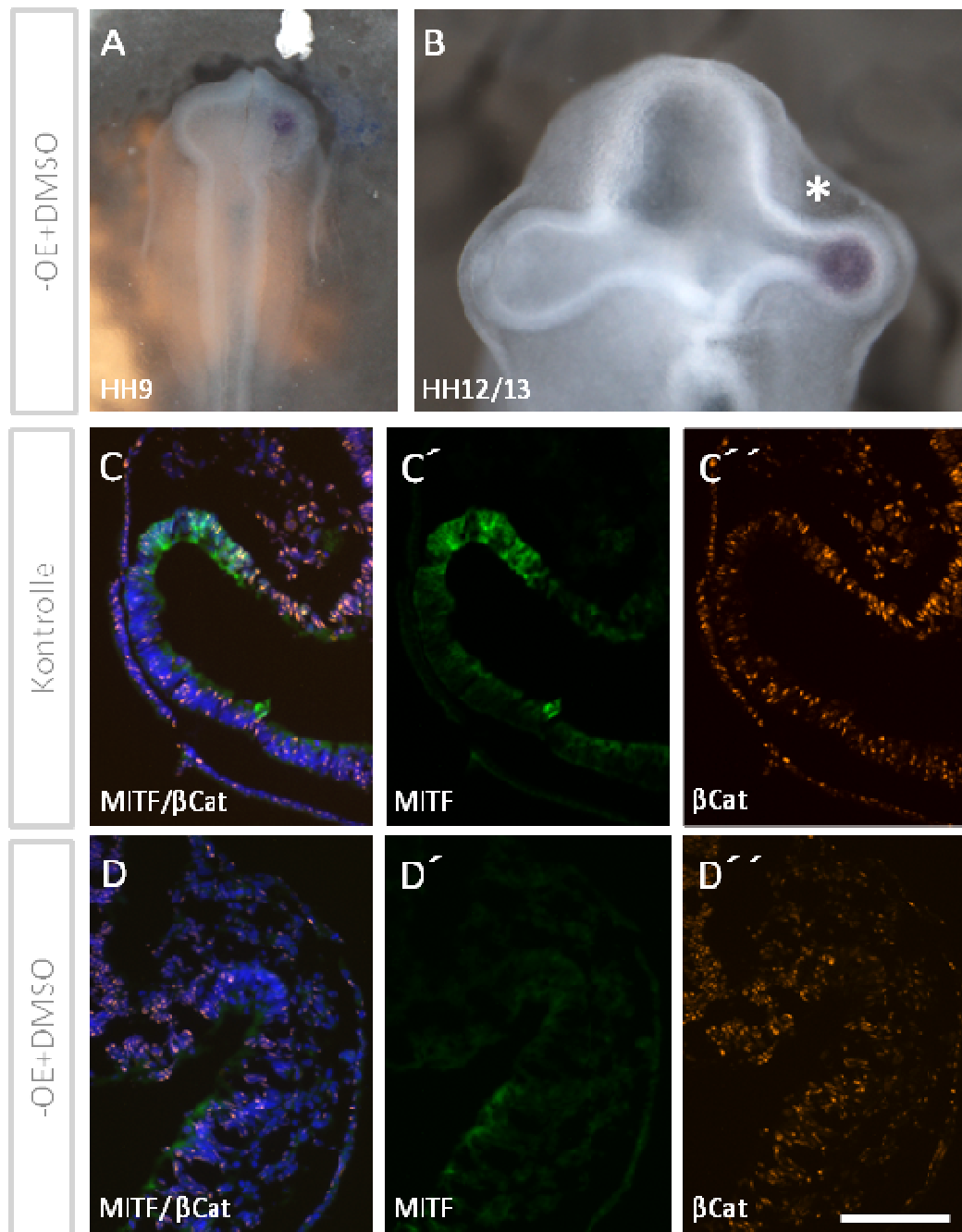


Abbildung 28: Die Lokalisation von MITF und β -Catenin wird durch DMSO nicht beeinflusst.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und DMSO-Applikation im Stadium HH9. B: Embryo zum Zeitpunkt der Fixierung 24 Stunden nach der Operation. C-D'': Immunfärbung auf Gefrierschnitten des Embryos im Stadium HH 12/13 (MITF/grün), (DAPI/blau), (β -Catenin/orange). MITF wird nicht durch DMSO induziert. Das behandelte Augenvesikel scheint deutlich weniger stark entwickelt, als das Augenvesikel auf der gegenüberliegenden Seite des Embryos (keine Augenbecherbildung). Der Maßstabsbalken in A-D' entspricht 100 μ m.

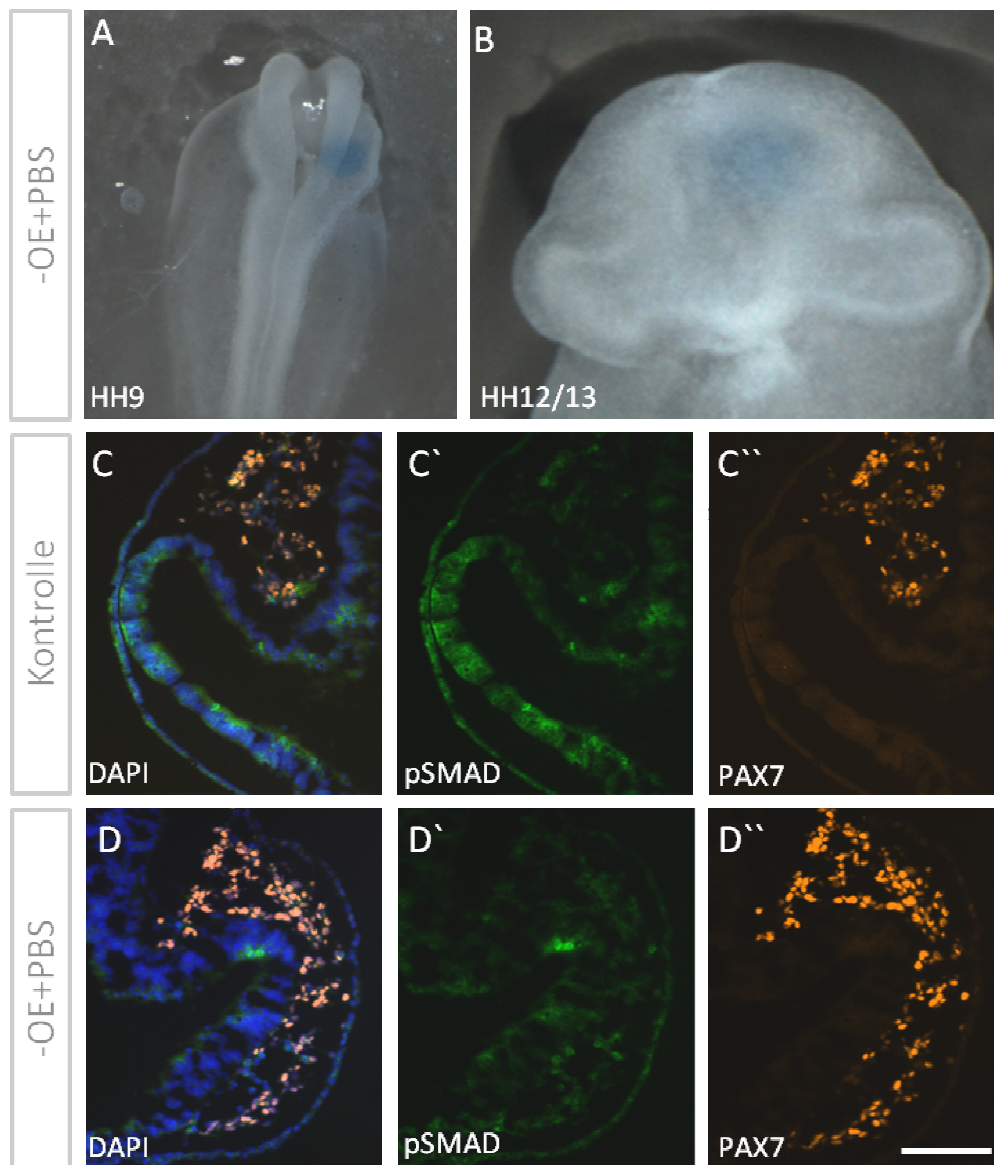


Abbildung 29: Weder PBS noch mesenchymale Zellen beeinflussen die Phosphorylierung von SMAD in Folge der Entfernung des Oberflächenektoderms.

A: Entfernung des Oberflächenektoderms und PBS-„bead“ Applikation im Stadium HH9. B: Embryo zum Zeitpunkt der Fixierung 24 Stunden nach der Operation. C-D'': Immunfärbungen (pSMAD/grün), (DAPI/blau), (PAX7/orange). Der Nachweis mesenchymaler Zellen erfolgt durch die Lokalisation von Pax7. pSMAD wird nicht durch PBS aufrecht erhalten (vergleiche C' mit D'). Ein Augenbecher hat sich nach der Behandlung nicht gebildet. Der Maßstabsbalken in A-D' entspricht 100 μ m.

3.10. Die Hemmung der WNT-Liganden führt zum Verlust der MITF-Lokalisation

Um die Frage, ob das WNT-Signal für die Spezifizierung des RPEs notwendig ist, abschließend zu beantworten, wurde der WNT-Signalweg zu unterschiedlichen Stadien der Augenvesikelbildung durch Antagonisten des WNT-Signalwegs inhibiert. Das in dieser Studie verwendete WIF1-Protein bindet alle WNT-Liganden und inhibiert sowohl den kanonischen als auch „nicht“-kanonischen WNT-Signalweg (Kawano and Kypta 2003). Bereits einen Tag nach der Behandlung mit diesem WNT-Inhibitor konnte ein drastischer Verlust der MITF-Konzentration in den Zellen des Augenvesikels gezeigt werden (n=9/14) (Abb. 30: D, D'), diese Veränderung führte nach drei Tagen zu einer Veränderung der Pigmentierung (Abb. 30: A-C).

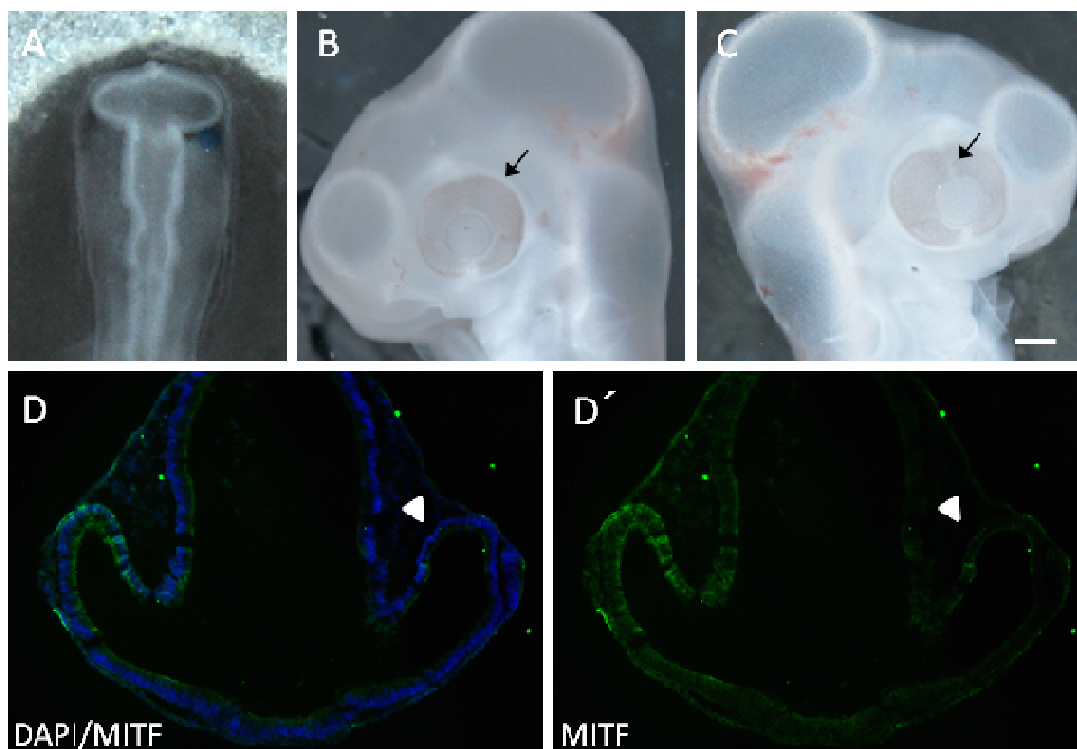


Abbildung 30: Für die Spezifizierung des RPEs ist das WNT-Signal von Bedeutung.

A: Embryo zum Zeitpunkt der WIF1 Applikation (HH9). B-C: Die Pigmentierung (Pfeil) im unbehandelten Auge (B) ist stärker als im behandelten Auge (C). C: Linse und Augenbecher haben sich auf der behandelten Seite normal entwickelt. D-D': Die MITF-Lokalisation ist auf der mit WIF1 behandelten Seite kaum nachzuweisen (Dreieck). Der Maßstabsbalken in C entspricht 1000 μm , in A = 22 μm und in D, D' 7 μm .

Das ebenfalls die WNT-Liganden inhibierende Protein sFRP-1 zeigte identische Effekte auf die frühe Augenentwicklung. Studien von Coronato veröffentlicht in Steinfeld et al., 2013 zeigen den deutlichen Verlust des MITF-Proteins im Bereich des mit sFRP-1 behandelten Augenvesikels. Obwohl das RPE in Folge der sFRP-1-Behandlung noch immer eine RPE-typische Morphologie aufwies, konnte der NR-spezifische Marker *Vsx2* in Bereichen der behandelten Augen nachgewiesen werden (s. zusätzliche Daten in Steinfeld et al., Coronato, 2013). In neun von vierzehn Fällen konnte durch die Bindung der WNT-Liganden gezeigt werden, dass die WNT-Signaltransduktion essenziell für die Spezifizierung des RPEs ist.

Da WIF1 die Bindung unterschiedlicher WNT-Liganden (sowohl kanonischer als auch nicht-kanonischer WNT-Liganden) an den Frizzled-Rezeptor verhindert, lässt sich über die Hemmung der WNT-Signaltransduktion auf Stufe der Ligandenebene noch keine Aussage zur Bedeutung des kanonischen oder nicht-kanonischen Signalwegs während der frühen Augenentwicklung treffen. Um eine mögliche Funktion des kanonischen oder nicht-kanonischen Signalwegs während der frühen Augenentwicklung genauer zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit in weiteren Versuchen der kanonische WNT/ β -Catenin Signalweg durch die Hemmung des LRP5/6 Rezeptors durch Dickkopf1 (DKK1) blockiert (Abb. 31). DKK1 hemmt den kanonischen WNT/ β -Catenin Signalweg selektiv über die Bindung an den LRP5/6 Rezeptor (MacDonald et al., 2009). Nach der Applikation von DKK1 in den Augenvesikel im Stadium HH10 (Abb. 31: A) war zwei Tage nach der Behandlung (HH24) kein Unterschied in der Pigmentierung des behandelten Auges (Abb. 31: B) und dem unbehandelten Auge (Abb. 31: C) festzustellen. Im Gegensatz zur verringerten MITF-Lokalisation durch die Hemmung der WNT-Proteine auf Ligandenebene (Abb. 30) schien die MITF-Lokalisation in Folge einer spezifischen Hemmung des kanonischen WNT/ β -Catenin Signalwegs durch DKK1 auf Ebene des LRP5/6-Rezeptors keinen Effekt auf die Bildung des MITF-Proteins im behandelten Augenvesikel (Abb. 31: E, E') zu besitzen (s. im Vergleich: unbehandeltes Auge, Abb. 31: D, D'). Auch bezüglich der pSMAD-Lokalisation im behandelten Auge (Abb. 31: G, G') konnte zwei Tage nach der Behandlung kein Unterschied zwischen der Lokalisation von pSMAD im unbehandelten Auge (Abb. 31: F, F') festgestellt werden. Meine Studien bestätigen daher die bisherigen Ergebnisse zur Entwicklung des Augenvesikels in der Maus, bei denen gezeigt

werden konnte, dass der WNT/ β -Catenin-Signalweg keine Funktion auf die RPE-Spezifizierung besitzt (Fujimura, Taketo et al. 2009).

3.11. Nicht der kanonische, sondern der nicht-kanonische WNT-Signalweg besitzt eine Funktion während der Spezifizierung der RPE-Domäne im frühen Augenvesikel

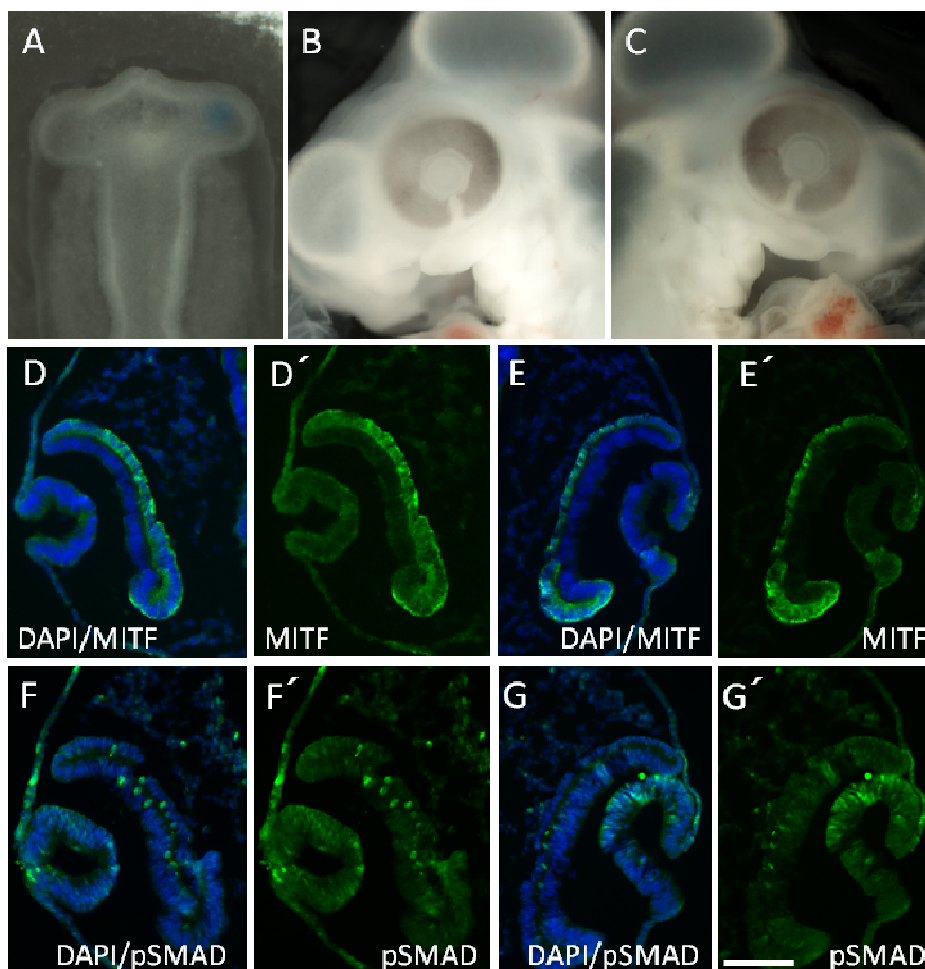


Abbildung 31: Für die Spezifizierung des RPEs ist das kanonische WNT-Signal nicht von Bedeutung.

A: Embryo zum Zeitpunkt der DKK1-Applikation (HH10). B-C: Die Pigmentierung im behandelten Auge (C) ist genauso stark wie im unbehandelten Auge (B). D-E': Eine MITF-Lokalisation ist auch im mit DKK1 behandelten Augenvesikel (E, E') zu sehen (vergleiche mit Kontrolle: D, D'). F-G': Die pSMAD-Lokalisation ist im behandelten Auge (G, G') genauso stark wie im unbehandelten Auge (F, F') zu sehen. Der Maßstabsbalken in C entspricht 1000 μ m, in A 22 μ m und in D, D' 7 μ m.

Die Studien zum Funktionsverlust der WNT-Signaltransduktion auf Ebene der Liganden oder Rezeptor-Hemmung haben sich auf alle Mitglieder der WNT-Familie bezogen. Die bisherigen Ergebnisse lassen daher keinen Schluss auf einen Zusammenhang der zu Beginn dieser Studie beschriebenen, im dorsalen Bereich lokalisierten *Wnt2b*-Expression und einer Funktion von *Wnt2b* auf die RPE-Spezifizierung zu. Um die Funktion von *Wnt2b* während der frühen RPE-Spezifizierung zielgerichtet zu untersuchen, wurde *Wnt2b*-„small interfering RNA“ (siRNA) im frühen Stadium des Augenvesikels in den Hühnerembryo elektroporiert (Abb. 32: A, B; D-D``). Ein der siRNA beigemischt *Gfp*-Plasmid ermöglichte die Kontrolle der erfolgreichen Elektroporation in den Augenvesikel (Abb. 32: B). Nach 24-stündiger Inkubation konnte bei 100% (n=6/6) der behandelten Embryonen kein Unterschied in der Akkumulation des MITF-Proteins zwischen dem mit siRNA-behandelten Auge und dem unbehandelten kontralateralen Auge festgestellt werden (Abb. 32: C-C``). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen überein, dass *Wnt2b*-Mausmutanten keinen auffälligen Phänotypen zeigen (Tsukiyama and Yamaguchi 2012).

3.12. Die alleinige Hemmung von *Wnt2b* führt nicht zum Verlust der MITF-Proteinlokalisierung

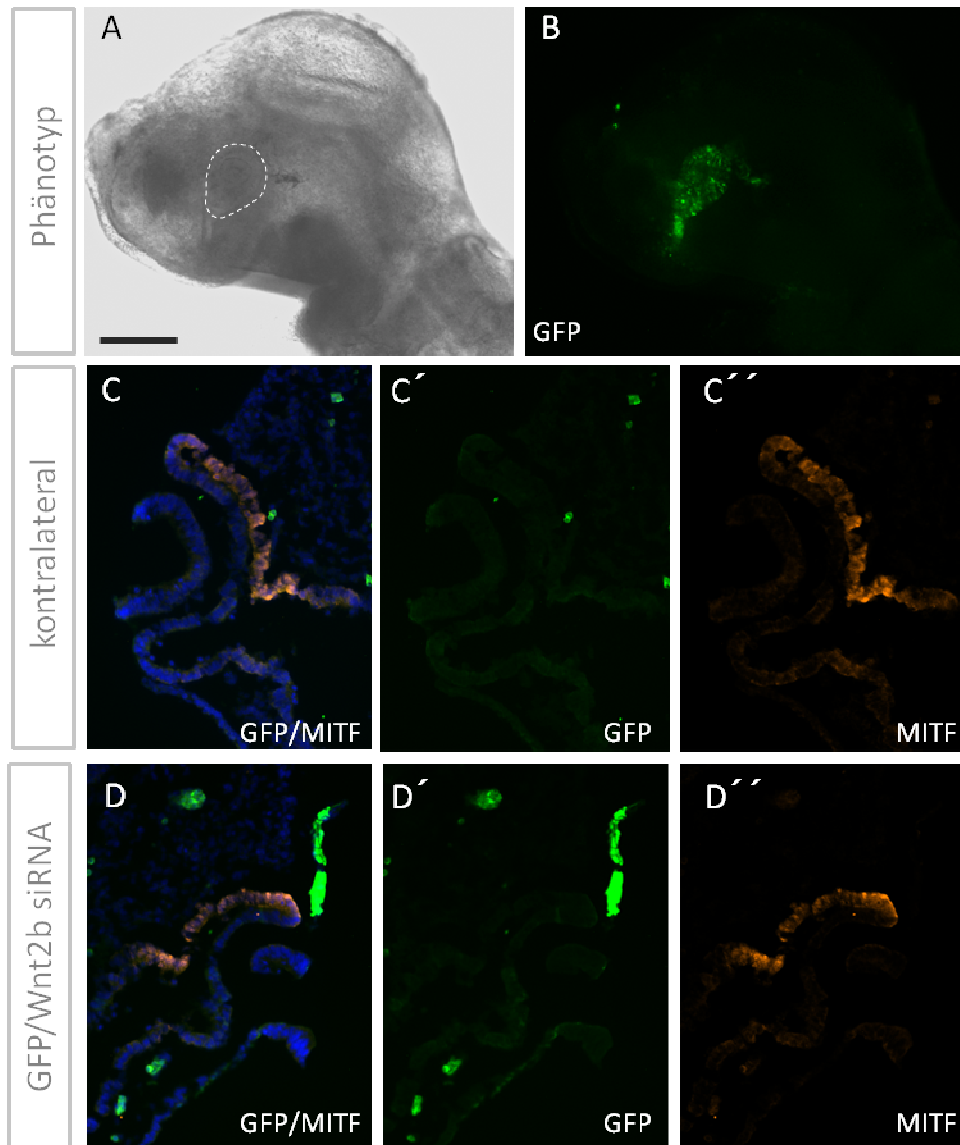


Abbildung 32: Die Hemmung von *Wnt2b* im Oberflächenektoderm wirkt sich nicht auf die MITF-Lokalisation im Augenvesikel aus.

A: Laterale Ansicht eines Embryos im Stadium HH13 einen Tag nach der Elektroporation von *Gfp/Wnt2b*-siRNA im Stadium HH8 in den Augenbereich (gestrichelte Linie). B: Fluoreszenzaufnahme von Bild A. Die GFP-Markierung befindet sich im Augenbereich. C, C'; D, D': DAPI Färbung (blau) und MITF (orange) im dorsalen RPE (Pfeil) des unbehandelten (C, C') und behandelten (D, D') Auges. Verglichen mit der unbehandelten Seite scheint die Lokalisation von MITF auf der behandelten Seite unverändert. D': Im Bereich des elektroporierten Auges ist im Vergleich zum unbehandelten Auge (C') eine starke *Gfp*-Markierung im dorsalen Bereich des Ektoderms zu sehen (Stern). Der Maßstabsbalken in A-B entspricht 300 µm. in C-D'' 27 µm.

Zusammengefasst zeigen die Daten der WNT-inhibitorischen Funktionsstudien, dass während der frühen Augenentwicklung möglicherweise ein WNT/ β -Catenin unabhängiger WNT-Signalweg an der RPE-Spezifizierung beteiligt ist.

3.13. Histologische Studien nach WNT- und AP-Behandlung

Um ein umfassenderes Verständnis bezüglich der WNT-Signaltransduktion auf die RPE-Spezifizierung zu erlangen, wurden zusätzlich zu den frühen Entwicklungsstadien spätere Entwicklungsstadien (drei Tage nach der WNT3a Applikation) untersucht. Die ursprünglichen Vorläufergewebe der NR und des RPEs haben sich zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung von einem pseudostratifiziertem NR-Epithel hin zu einem vielschichtigen NR- Epithel und von einem noch unpigmentierten RPE hin zu einem auf der basalen Seite stark pigmentierten RPE entwickelt. Durch die weitere Spezifizierung der Gewebe konnten histologische Erkenntnisse gewonnen werden, die zu den früheren Stadien der Fixierung nicht möglich gewesen wären. Diese Untersuchungen zeigten, dass die mit WNT3a behandelten Augen nach drei Tagen ein kleines pigmentiertes Auge (Abb. 33: B) mit einer rudimentären Linse (Abb. 33: B, D) im distalen Bereich ausbildeten. Die Augenbecherbildung schien in Folge des aktivierten WNT-Signalwegs unterbunden. Der im Stadium HH10 behandelte Augenvesikel schien stattdessen einen vollständig pigmentierten Vesikel zu bilden (Vergleiche Abb. 33: H mit I), in dem sich das prospektive NR-Gewebe scheinbar in Richtung eines einschichtigen pigmentierten RPE-ähnlichen Gewebes respezifiziert (Vergleiche Abb. 33: E mit F und G). Neben der Hemmung der NR-Entwicklung konnte in zahlreichen Fällen der Verlust der optischen Fissur festgestellt werden (siehe Bild Abb. 33: A und B im Vergleich).

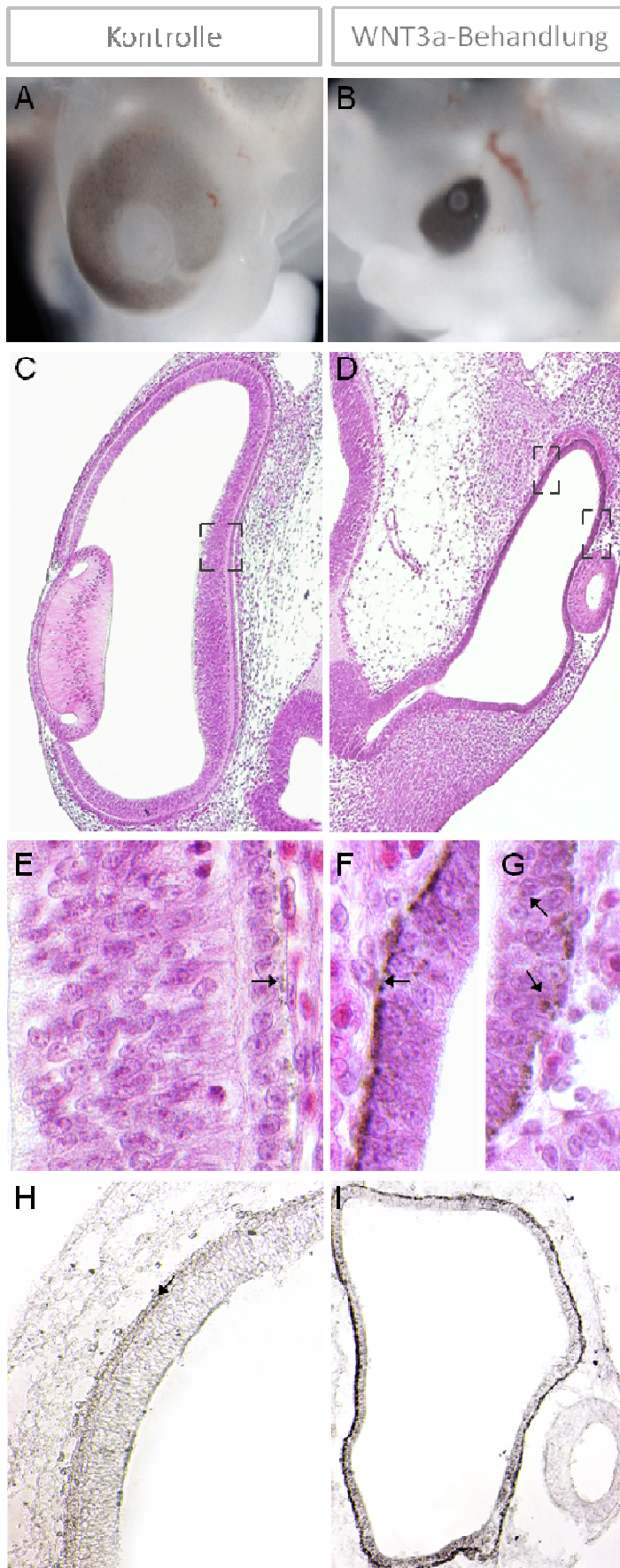


Abbildung 33: WNT3a führt zur Hyperpigmentierung des optischen Vesikels und unterdrückt die Bildung des Augenbechers.

A-B: Augenphänotypen eines Embryos (HH25) nach der Behandlung des Augenvesikels mit WNT3a im Stadium HH10 (A = unbehandeltes Auge, B = behandeltes Auge). Das behandelte Auge (B) ist deutlich kleiner und stärker pigmentiert als das unbehandelte Auge (A). C-D: Paraffinschnitte eines mit WNT3a-behandelten Embryos im Stadium HH25 (Hämatoxylin/Eosin-Färbung). Das behandelte Auge (D) ist deutlich kleiner als das unbehandelte Auge (C) und hat keinen Augenbecher ausgebildet. E: Vergrößerung des unbehandelten Auges in C (Eingrenzung). Die Vergrößerung zeigt die pseudostratifizierte NR und das einschichtige RPE (Pigmentgranula, Pfeil). F, G: Vergrößerung der in D eingegrenzten Bereiche. F: Das proximale RPE ist stark hyperpigmentiert (Pfeil). G: Auch distal ist eine starke Hyperpigmentierung im Bereich der pseudostratifizierten NR zu erkennen (Pfeile). H, I: Hellfeldaufnahmen der Augenphänotypen in A und B (H = periphere Augenregion des Phänotyps in A, I = Übersicht des Augenphänotyps in B). H: Das RPE ist normal pigmentiert (Pfeil). I: Das mit WNT3a-behandelte Augenvesikel ist deutlich hyperpigmentiert (siehe H im Vergleich).

Da WNT3a sowohl den kanonischen als auch nicht-kanonischen WNT-Signalweg aktivieren kann, wurde der kanonische WNT-Signalweg durch den Gebrauch von Alsterpaullone, einem spezifischen GSK3- β Inhibitor, nachgeahmt. Im Huhn wie auch im Frosch kooperieren WNT- und BMP-Signale bei der Induktion eines epidermalen Zellschicksals (Wilson, Rydstrom et al. 2001; Fuentealba, Eivers et al. 2007; Patthey, Edlund et al. 2009). Die WNT-vermittelte GSK3- β -Hemmung stabilisiert die BMP-Signaltransduktion durch eine verhinderte Degradation des pSMAD1 und induziert dadurch ein epidermales Zellschicksal (Fuentealba et al., 2007). Um herauszufinden, ob während der Musterbildung des Augenvesikels ein ähnlicher Mechanismus abläuft, wurde in dieser Studie die GSK3- β mit dem chemischen Stoff Alsterpaullone (AP) in den Stadien HH8-10 (9-14 Somiten) inhibiert.

In Folge der Behandlung erinnerte der Phänotyp stark an den „Microphthalmia“ (kleines Auge) ähnlichen Phänotyp nach der Behandlung mit WNT3a (vergleiche Abb. 33 mit Abb. 34 (WNT3a mit AP)). Nach drei-tägiger Entwicklung war das behandelte Auge deutlich kleiner und stärker pigmentiert (n=34/41) als das unbehandelte Auge (vergleiche Abb. 33, 34: C, C' mit D, D'). Die Morphologie des behandelten Auges 3 Tage nach der Behandlung ähnelte in seiner Struktur einem gänzlich pigmentierten Augenvesikel mit distal anliegender Linse (Abb. 34: D'). Eine Invagination zum Augenbecher schien unterbunden oder stark verzögert zu sein (Abb. 34: D'). Während die Pigmentgranula im unbehandelten Auge auf die basale Region der einzelligen RPE-Schicht konzentriert zu sein schienen, waren im behandelten Auge auch apikal des einschichtigen RPEs Pigmentgranula lokalisiert (vergleiche Abb. 34: E mit F). Neben der weitläufigen Pigmentierung innerhalb des gesamten „Augenvesikels“, war das „eigentliche RPE“ deutlich hyperpigmentiert (Abb. 34: B, D, D').

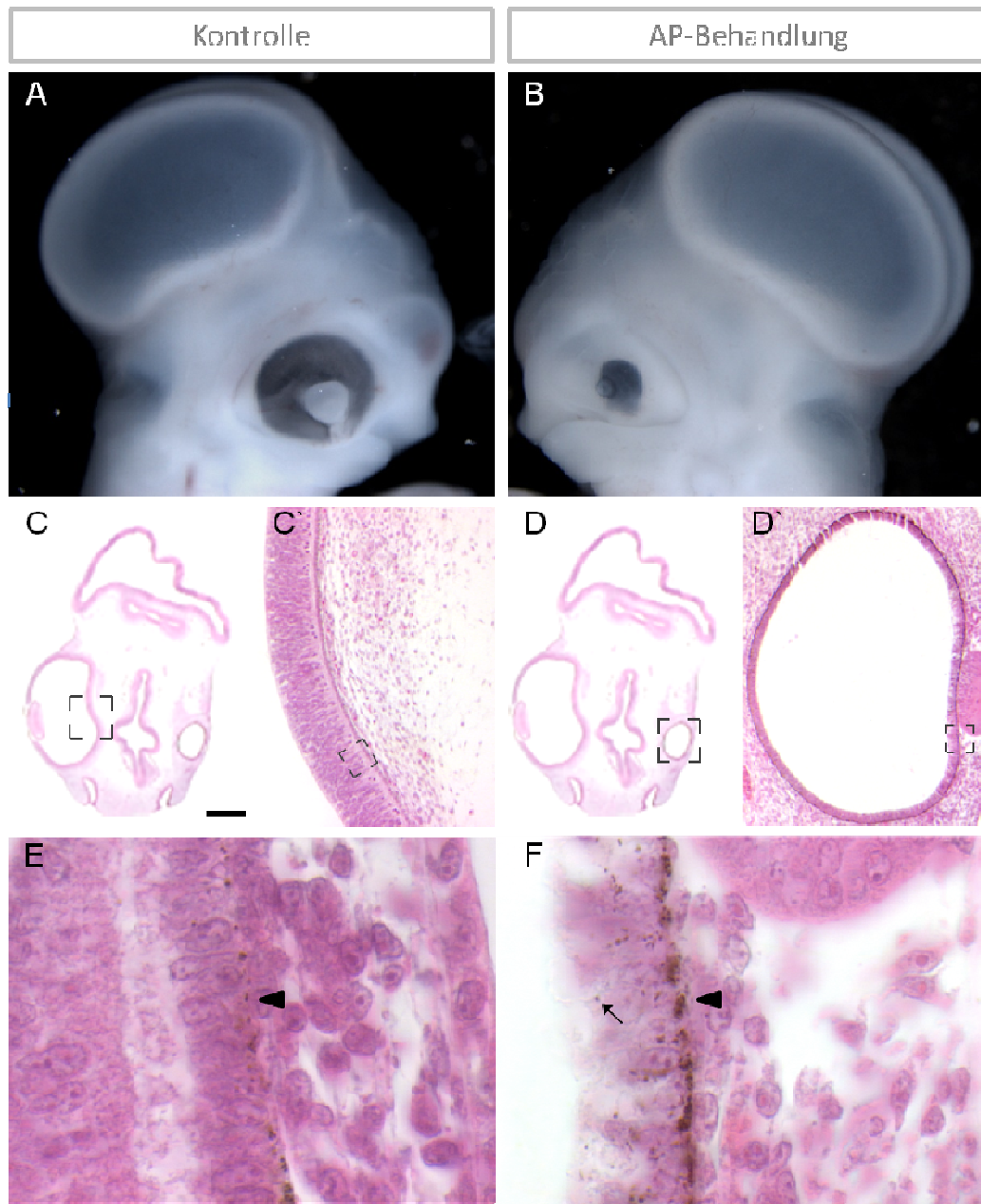


Abbildung 34: Die Alsterpaullone vermittelte GSK3- β -Hemmung induziert RPE im distalen Augenvesikel.

A, B: Phänotyp zum Zeitpunkt der Fixierung (HH25) nach erfolgter Alsterpaullone-Applikation in das linke Augenvesikel (HH10). C-F: Hämatoxylin/Eosin-Färbung des AP-behandelten Embryos in der Übersicht (C, D) und vergrößert (C', D'). Im Gegensatz zum unbehandelten Auge (C), bildet das AP-behandelte Auge keinen Augenbecher aus. E: Im unbehandelten Auge kann man eine leichte Pigmentierung auf der apikalen Seite des RPEs erkennen. F: Die prospektive NR weist nach der AP-Behandlung eine verstärkte Pigmentierung auf der basalen Seite auf (Dreieck), während vereinzelt auch Pigmentgranula auf der apikalen Seite zu finden sind. Der Maßstabsbalken in C entspricht 500 μm , in C' 50 μm , in D' 70 μm und in E, F 8,4 μm .

Die Nachahmung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalwegs durch die Hemmung der GSK3- β im Augenvesikel führte nicht nur zu „Microphthalmia“ und einer Hyperpigmentierung des Augenvesikels, sondern auch zur Pigmentierung des Augenstiels (Abb. 35: A-D). Während die Pigmentierung im unbehandelten Auge auf den basalen Bereich des RPEs begrenzt war, schien der Sehnerv des behandelten Auges die Morphologie eines stark pigmentierten Augenstiels aufzuweisen (Abb. 35: C-F). Die Vergrößerungen zwischen dem behandelten Augenstiel (Abb. 35: D) und dem unbehandelten Sehnerv (Abb. 35: B) zeigten im behandelten Augenvesikel eine starke Pigmentierung im gesamten basalen Bereich. Die Hyperpigmentierung schien im zentralen Bereich des Augenstiels zurückzugehen. In wenigen Fällen (Abb. 35: E) konnte neben der starken Hyperpigmentierung des Augenstiels eine noch stärkere Hyperpigmentierung im Bereich der distalen prospektiven NR festgestellt werden. Das im Vergleich zum proximalen Gewebe deutlich vielschichtige Gewebe unterhalb der Linse wies durch seine starke Pigmentierung auf die Respezifizierung eines ursprünglich vielschichtigen NR Gewebes in Richtung eines RPE ähnlichen Zellschicksals hin.

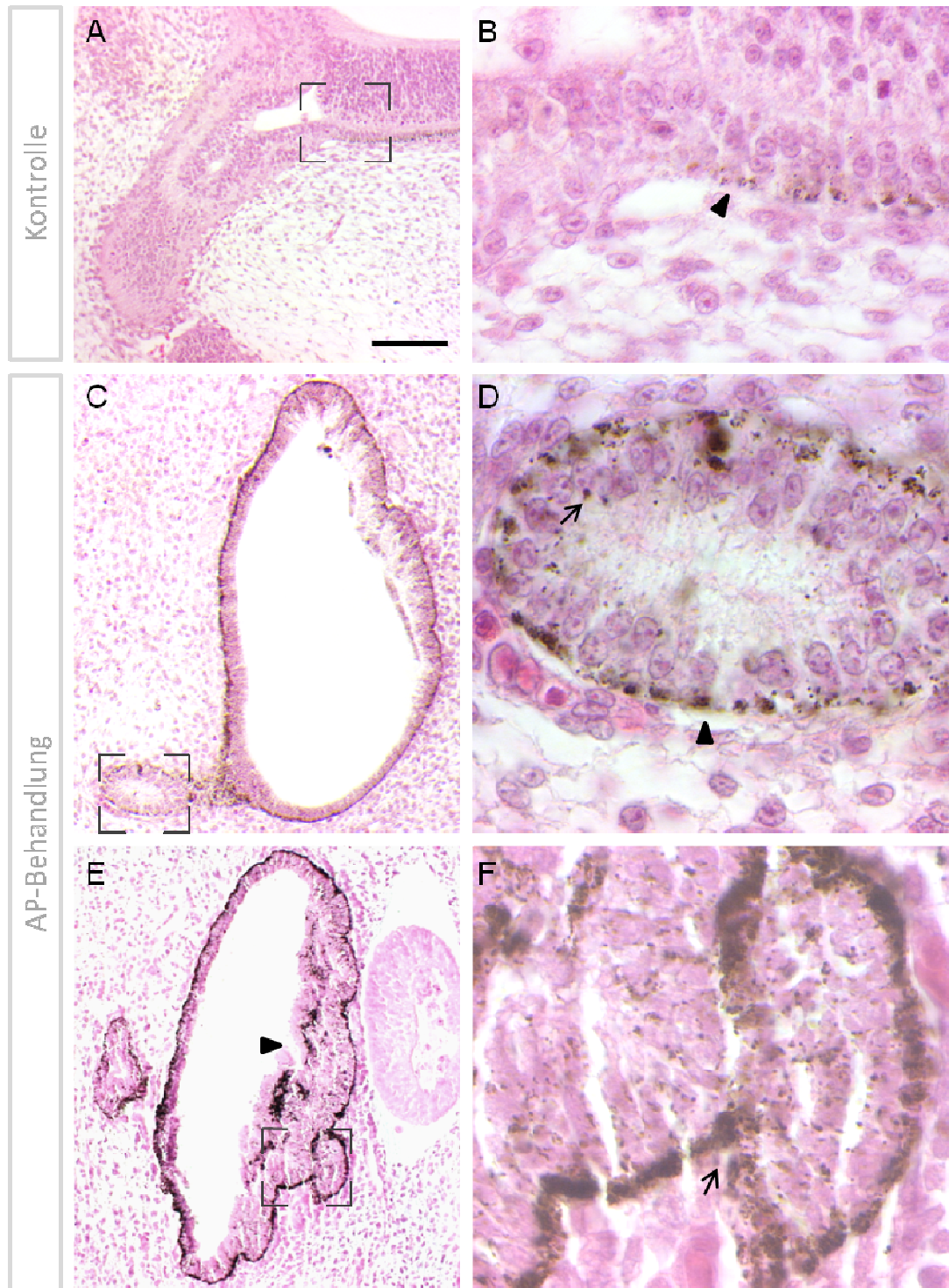


Abbildung 35: Die Hemmung der GSK3- β führt im Huhn zur Pigmentierung des Augenstiels und der prospektiven Retina.

A-F: Hämatoxylin/Eosin Färbung an Paraffinschnitten eines im Stadium HH10 mit Alsterpaullone behandelten Hühnerembryos zum Entwicklungsstadium HH25. A: Übersicht über den Sehnerv des unbehandelten Auges. B: Die Vergrößerung des in A eingegrenzten Bereichs zeigt deutlich die Grenze (Dreieck) zwischen dem basal pigmentierten RPE und dem unpigmentierten Sehnerv. C: Das behandelte Auge zeigt einen stark pigmentierten Augenstiel (Eingrenzung). D: Die Vergrößerung des in C eingegrenzten Bereichs gibt eine starke Pigmentierung auf der basalen Seite (Dreieck) und im inneren (Pfeil) des Augenstiels wieder. E: Die NR im distalen optischen

Vesikel ist respezifiziert und stark pigmentiert (Dreieck). F: Vergrößerung des eingegrenzten Bereichs in E. Neben der starken Pigmentierung des basalen RPEs (Pfeil) ist auch das apikale Gewebe stark pigmentiert. Der Maßstabsbalken in A, E und C entspricht 100 μm , in B 16 μm und in D, F 12 μm .

Die AP vermittelte Hemmung der GSK3- β führte im Gewebe des operierten und hyperpigmentierten Augenvesikels (Abb. 36: A) zu einer deutlichen Akkumulation des für die initiale RPE-Spezifizierung spezifischen Markers MITF (Abb. 36: B, C). Während die Behandlung des Augenvesikels mit Alsterpaullone im Stadium HH10 MITF hochregulierte, führte die Hemmung der GSK3- β zum Verlust der Augenbecherbildung und zum Verlust einer vielschichtigen NR. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen war der für die NR spezifische Marker *Vsx2* in Folge der AP-Applikation im behandelten Auge deutlich herunterreguliert (Abb. 37: A). Während sich die *Vsx2*-Expression im unbehandelten Auge auf den Bereich der vielschichtigen NR beschränkte (Detailansicht: B), schien diese im hyperpigmentierten Augenvesikel im Bereich der ehemals prospektiven NR-Domäne deutlich herunterreguliert zu sein (Abb. 37: C). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die WNT-vermittelte GSK3- β Inhibition unabhängig von nukleärem β -Catenin, dazu in der Lage ist, MITF in den Zellen des Augenvesikels zu induzieren.

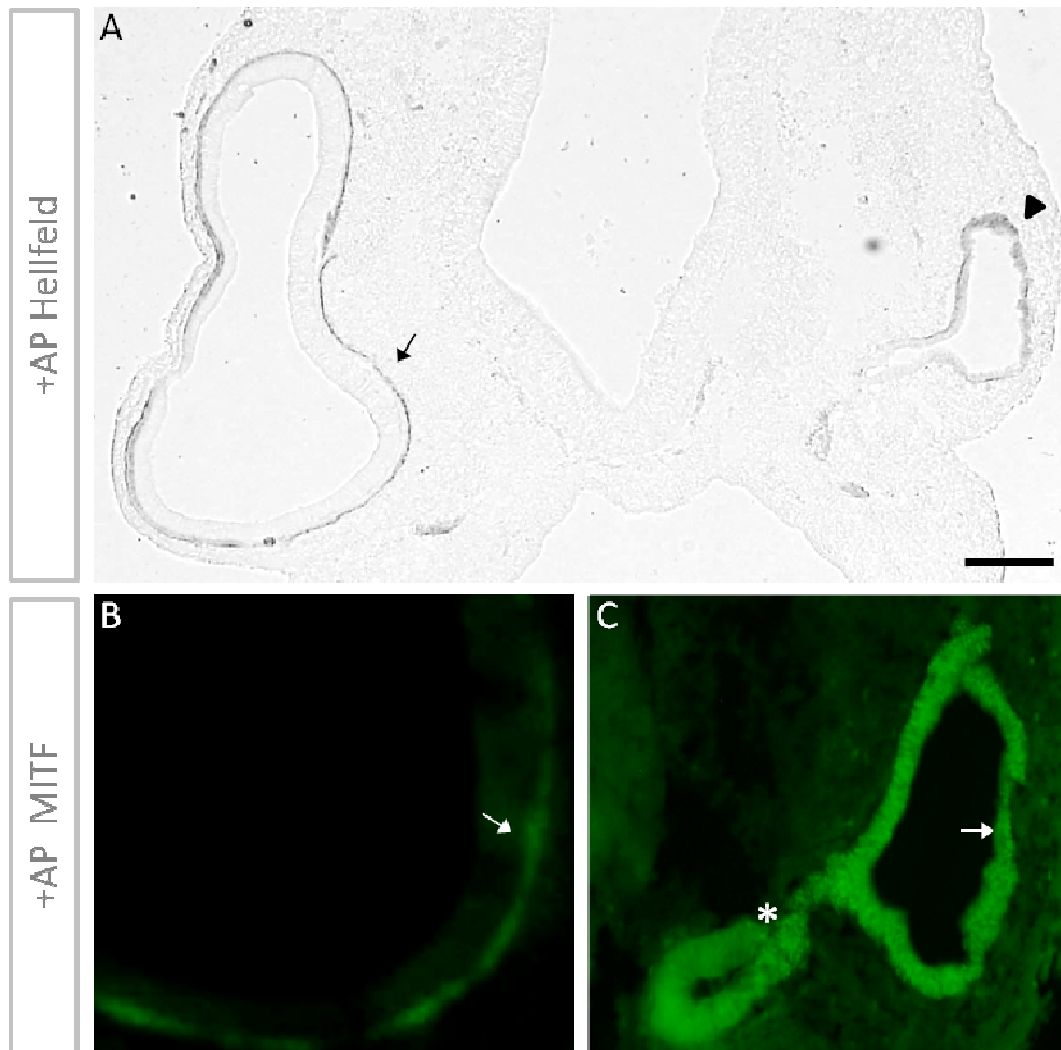


Abbildung 36: Die GSK3- β -Hemmung im Augenvesikel induziert die MITF-Lokalisation in der prospektiven Retina und im Augenstiel.

A: Übersicht eines zum Augenvesikelstadium (HH10) mit AP behandelten Embryos (E4). Das behandelte Augenvesikel ist stark verkleinert und hyperpigmentiert (Dreieck), während das unbehandelte Auge nur auf der basalen Seite des RPEs (Pfeil) pigmentiert ist. B: Die MITF-Lokalisation ist auf das einschichtige RPE begrenzt (Pfeil). C: Das behandelte Augenvesikel zeigt eine stark hoch regulierte MITF-Lokalisation im Bereich der prospektiven Retina (Pfeil) und im Bereich des Augenstiels (Stern). Der Maßstabsbalken in A entspricht 100 μm , in B 80 μm und in C 44 μm .

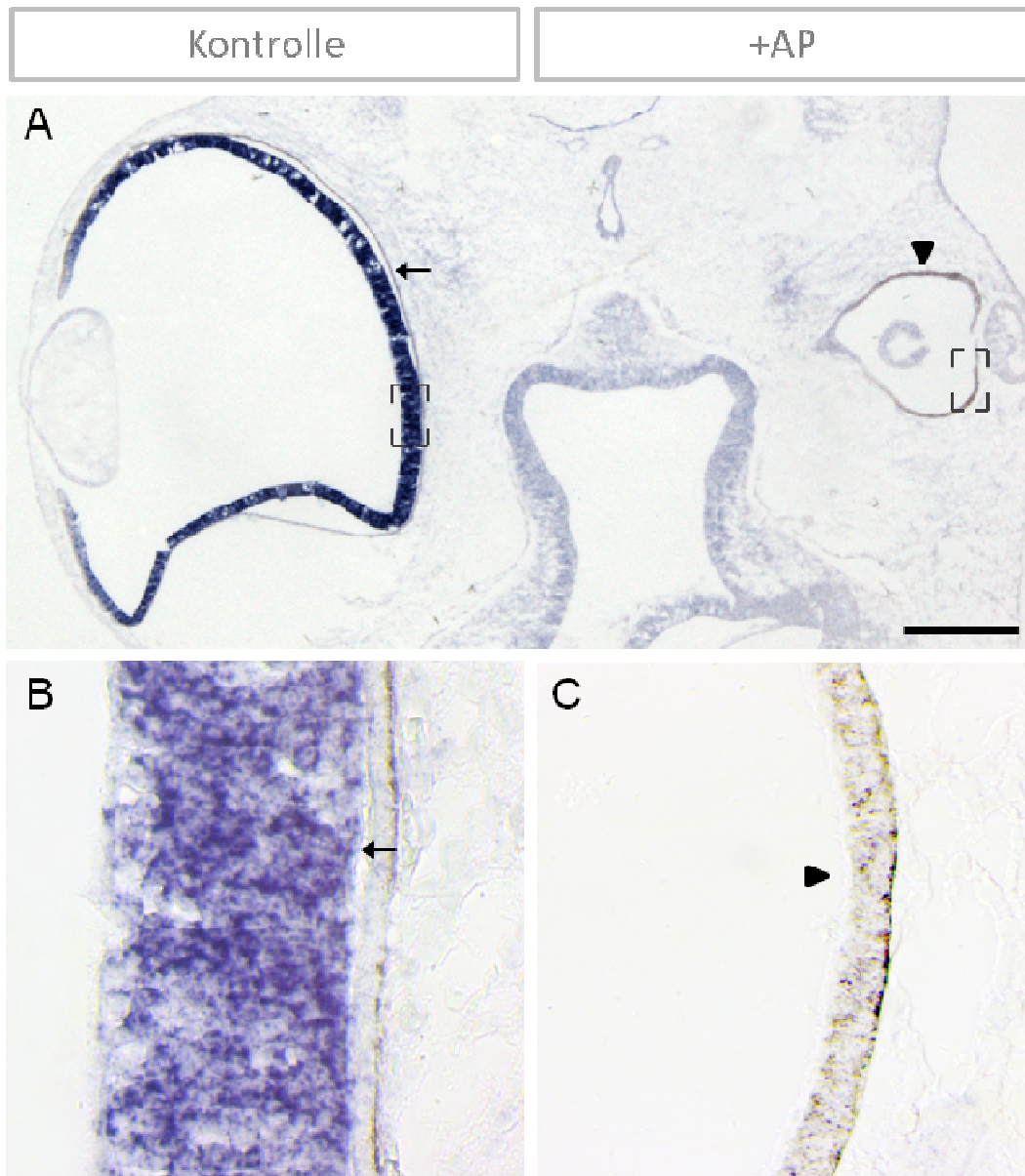


Abbildung 37: Die GSK3- β -Hemmung im Augenvesikel führt im gesamten behandelten Auge zu einer drastischen Reduktion von *Vsx2*-Transkripten.

A: *Vsx2*-Expression (E6) drei Tage nach erfolgter GSK3- β -Hemmung (HH10) am Querschnitt durch den Augenbereich. Auf der mit AP behandelten Seite (Dreieck) hat sich ein stark pigmentiertes und im Vergleich zur kontralateralen Seite (Pfeil) verkleinertes Augenvesikel gebildet. B: Vergrößerung der unbehandelten Augenregion in A (Eingrenzung links). Innerhalb der NR (Pfeil) ist *Vsx2* stark exprimiert. C: Vergrößerung der mit AP behandelten Augenregion (Eingrenzung rechts). In Folge der GSK3- β -Hemmung ist die *Vsx2*- Expression drastisch herunter-reguliert. Der Maßstabsbalken in A entspricht 1000 μ m.

3.14. Die Hemmung der GSK3- β führt zu einer MITF-Lokalisation unabhängig von einer nukleären β -Catenin Translokation

Die Hemmung der GSK3- β hat normalerweise zur Folge, dass β -Catenin in den Zellkern der Zellen transloziert. Interessanterweise konnte jedoch durch AP keine oder im Vergleich zum unbehandelten Auge (Abb. 38: C, D) eine nur sehr schwache Akkumulation (n=6/6) von β -Catenin in den Zellkernen des mit AP behandelten Neuroepithels gefunden werden (Abb. 38: B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die WNT-vermittelte GSK3- β -Hemmung unabhängig von einem nukleären β -Catenin Transfer zu einer induzierten MITF-Lokalisation in den Zellen des Augenvesikels führt.

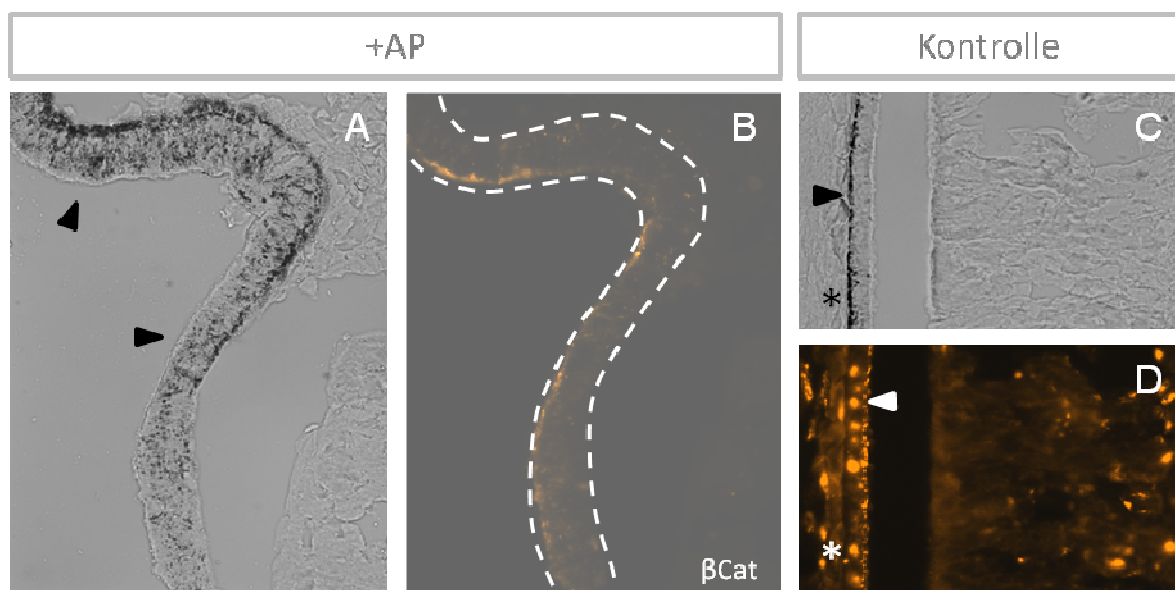


Abbildung 38: Die GSK3- β Hemmung im Augenvesikel führt nicht zur Akkumulation von nukleärem β -Catenin.

A: Hyperpigmentierung in Folge der GSK3- β -Hemmung B: Das mit AP behandelte Auge (HH10) zeigt in Folge der Behandlung ein vielschichtiges hyperpigmentiertes Epithel (Dreiecke) anstelle des einschichtigen RPEs im Wildtyp (s. Dreieck: C, D), dem eine vielschichtige NR anliegt. Trotz Hemmung der GSK3- β kann keine Akkumulation von nukleärem β -Catenin im Bereich des hyperpigmentierten Epithels, nachgewiesen werden (gestrichelte Linie). C: Das unbehandelte kontralaterale Auge zeigt ein einschichtiges RPE mit starker Pigmentierung auf der basalen Seite (Stern). D: Im WT kann nukleäres β -Catenin sowohl im RPE als auch auf der basalen Seite der NR im zentralen Auge zu E6 nachgewiesen werden.

3.15. *In vitro* Studien zum Funktionsverlust der GSK3- β durch die Applikation von Alsterpaullone (Bestätigung der *in vivo* Ergebnisse)

Die Etablierung der Organkultur *in vitro* dient als Voraussetzung, die in dieser Studie dargestellten Untersuchungen auch an der Maus durchführen zu können. Aus zeitlichen Gründen wurde in dieser Studie jedoch darauf verzichtet, die Maus vergleichend zu untersuchen. Auch im Bezug auf den Hühnerembryo können *in vitro* Studien ergänzend zum Verständnis der Augenentwicklung beitragen. Da sich der Hühnerembryo *in ovo* dreht, besteht keine Möglichkeit, die Augenentwicklung des operierten und kontralateralen Auges zu allen Zeitpunkten vergleichend zu studieren. Durch die *in vitro* Kultur des gesamten Prosencephalons auf einer festen Matrix ist das Studium der auswachsenden Augenvesikel sowie die Bildung der Augenbecher zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung möglich. Neben der Möglichkeit, die frühe Augenentwicklung im direkten Vergleich zwischen Kontrolle und behandelter Seite *in vitro* auf einer Ebene studieren zu können, ermöglicht die *in vitro* Kultur die Applikation eines in DMSO inkubierten „beads“ auf der kontralateralen Seite im gleichen Bereich wie dem gegenüberliegenden mit AP behandelten Augenvesikel (Abb. 39). Die sich *in vitro* entwickelnden Augen wurden zu definierten Zeitpunkten (alle drei Stunden, Daten nur zum Teil gezeigt) abgelichtet und auf Veränderungen in Morphologie und Pigmentierung untersucht. Die in dieser Arbeit dargestellten morphologischen und molekularen Studien der *in vitro* Kultur zeigten in Folge der durch Alsterpaullone hervorgerufenen GSK3- β -Hemmung ähnliche Ergebnisse wie die Versuche *in ovo*. Die mit Alsterpaullone behandelte Augenexplantate (33 Std. nach der Behandlung) zeigten die Morphologie eines stark verkleinerten Auges (Microphthalmia) und eine deutlich stärkere Pigmentierung (70%, Abb. 39: D).

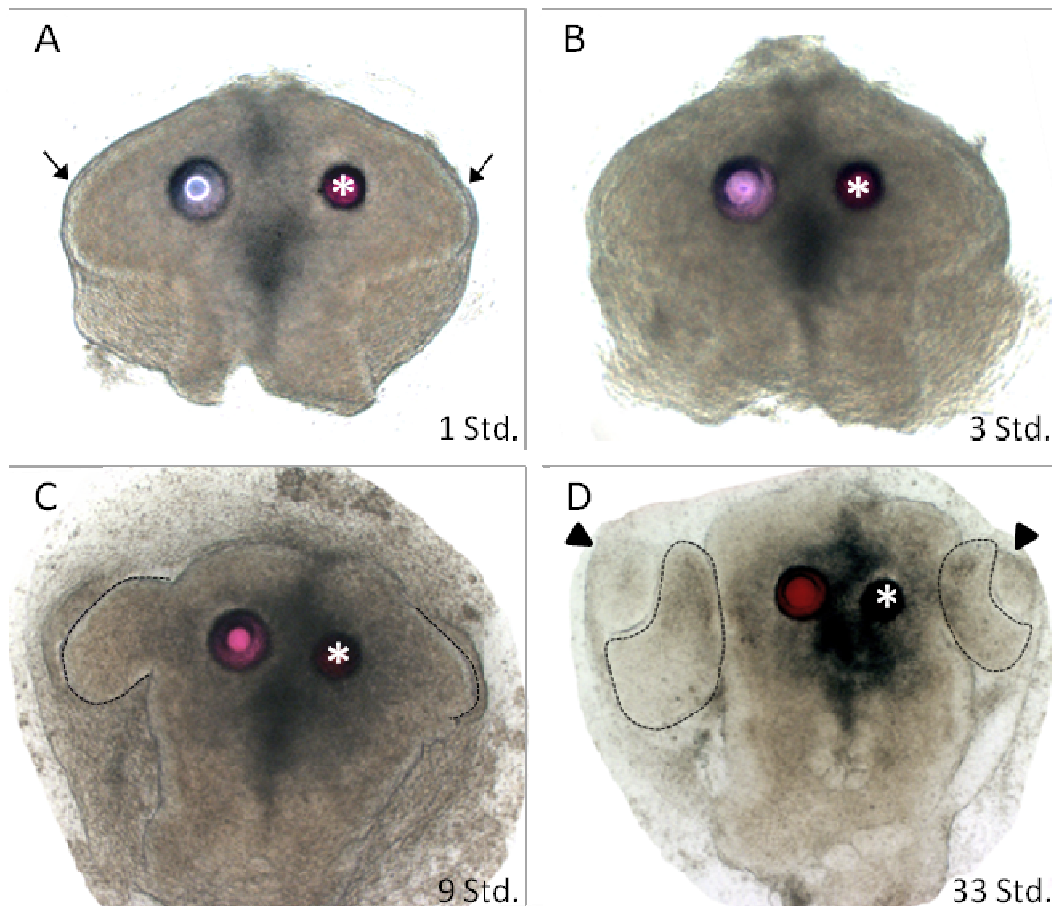


Abbildung 39: Die Hemmung der GSK3- β *in vitro* bewirkt die Bildung eines kleineren Augenbechers.

A-D: *In vitro* Organokultur des Vorderhirnbereiches in Folge einer AP (Stern) und DMSO-„bead“ Applikation im Bereich der auswachsenden Augenvesikel (Pfeile) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung (1-33 Std.). A-B: Die Behandlung der Augenvesikel lässt keine morphologische Veränderung erkennen. C: Das mit AP behandelte Augenvesikel (gestrichelte Linie rechts) ist nach neun Stunden deutlich weniger stark entwickelt als das mit DMSO behandelte Augenvesikel (gestrichelte Linie links). Nach 33 stündiger Inkubation scheint sich auf beiden Seiten eine Linse (Dreiecke) und ein Augenbecher (Eingrenzung) gebildet zu haben. Der mit AP behandelte Augenbecher ist deutlich kleiner.

MITF, ein Marker für das frühe RPE, ist im Vergleich zum unbehandelten Auge in Folge der GSK3- β -Hemmung im gesamten behandelten Auge nachweisbar (Abb. 40: B).

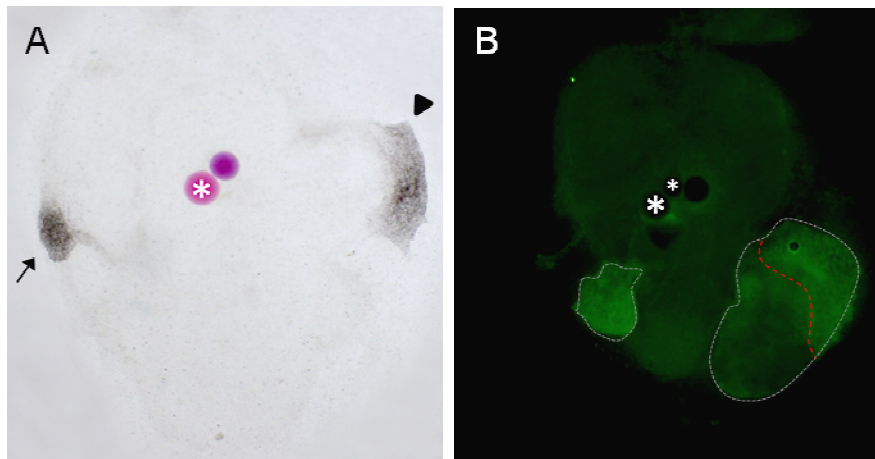


Abbildung 40: Die Hemmung der GSK3- β *in vitro* führt zur Hyperpigmentierung.

A,B: Organokultur zu E5 nach erfolgter AP Applikation. A: Phänotypen nach der Behandlung mit in AP (Stern) und DMSO inkubierten „beads“ zu E5 (Hellfeldaufnahme). Die zwischen HH9-10 applizierten „beads“ haben sich mit dem Auswachsen der Augenvesikel von distal nach proximal verschoben (siehe Abbildung 34). A: Das mit AP behandelte Augenvesikel (Pfeil) ist im Vergleich zu dem mit DMSO behandelten Augenvesikel (Dreieck) deutlich kleiner und stärker pigmentiert. B: Der mit AP behandelte Augenvesikel zeigt im gesamten Vesikel eine starke MITF-Lokalisation. MITF auf der mit DMSO behandelten Seite ist begrenzt (rote Eingrenzung).

3.16. BMP-Signale sind essenziell für die MITF-Lokalisation während der RPE-Spezifizierung

Um herauszufinden, ob WNT-Signale alleine ausreichen, um die Spezifizierung des RPEs zu induzieren oder aufrecht zu erhalten, wurden in dieser Studie zeitgleich jeweils ungefähr gleich große in NOGGIN und in WNT inkubierte „beads“ nebeneinander in den Augenvesikel des Hühnerembryos appliziert. Interessanterweise reichte der aktivierte WNT-Signalweg bei gleichzeitiger Hemmung der BMP-Signaltransduktion in den Stadien HH9-10 nicht aus, um eine MITF-Lokalisation zu induzieren (n=4/5 Behandlungen) oder aufrecht zu erhalten. Das Kontrollexperiment in Form einer Applikation von jeweils zwei PBS-„beads“ in den rechten Augenvesikel (Abb. 41: A) zeigte keinen Effekt auf die weitere Augenentwicklung. Zum Zeitpunkt der Fixierung (Abb. 41: B) zeigte der mit PBS behandelte Augenvesikel morphologisch keinen Unterschied zum unbehandelten kontralateralen Augenvesikel. Die Lokalisation des MITF-Proteins war in beiden Augenvesikeln gleich (vergleiche Abb. 41: C, C' mit D, D'). Der Phänotyp des mit NOGGIN und WNT3a behandelten Embryos zeigt zum Zeitpunkt seiner Fixierung keine morphologischen Auffälligkeiten. Histologische Studien bezüglich der MITF-Lokalisation nach aktiviertem WNT- und inhibierten BMP-Signalweg

ließen im Vergleich zum kontralateralen Auge (Abb. 41: G, G`) einen kompletten Verlust oder eine starke Herunterregulierung des MITF-Proteins erkennen (Abb. 41: H, H`). Diese Ergebnisse zeigten, dass BMPs in Abwesenheit des aktivierten WNT-Signalwegs nicht ausreichend waren, um MITF in den Zellen des Augenvesikels zu induzieren.

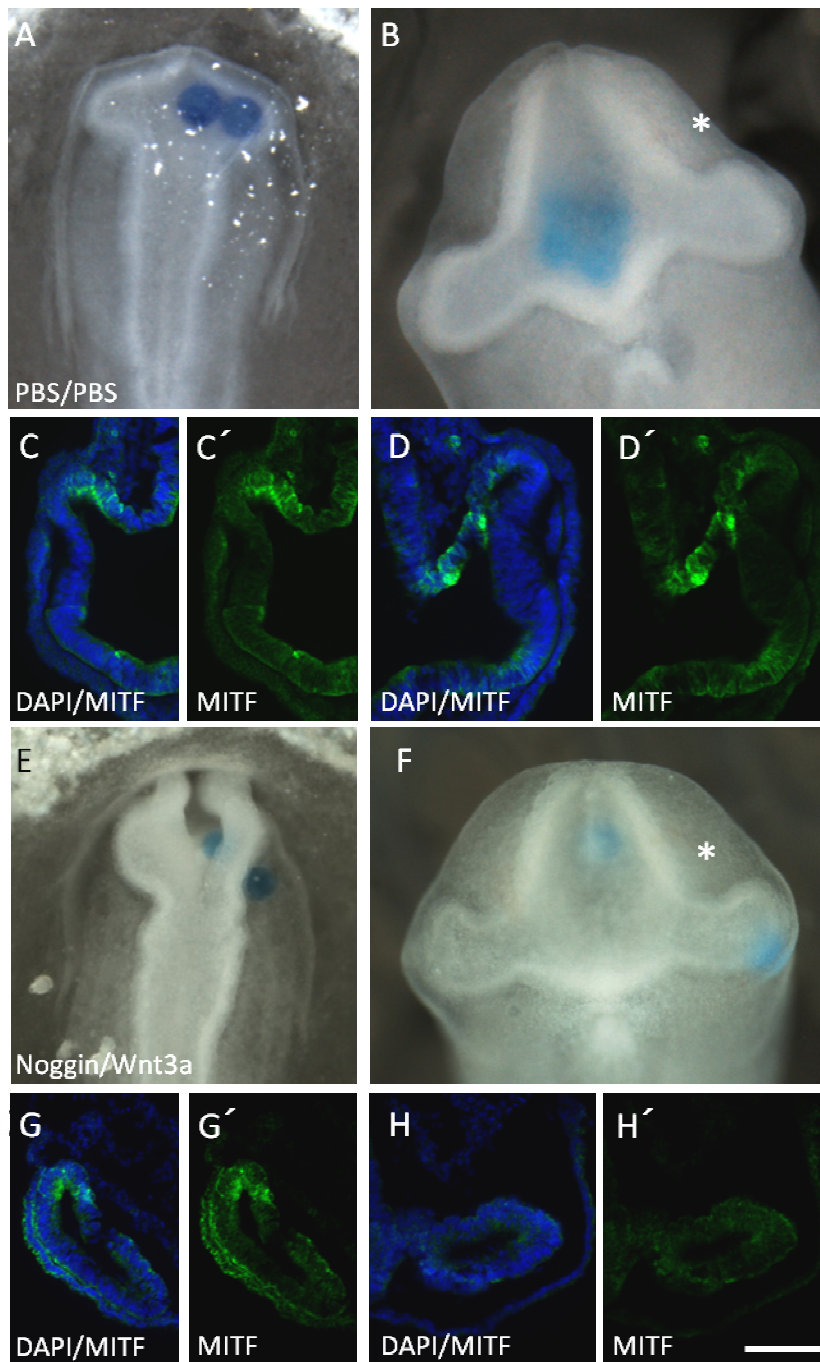


Abbildung 41: Der aktivierte BMP-Signalweg ist essenziell für die MITF-Lokalisation während der anfänglichen RPE-Spezifizierung.

A-D': PBS-Kontrolle. A-B: Der im Stadium HH9+ mit zwei PBS-„beads“ behandelte Embryo (A) zeigt bei der Fixierung im Stadium HH14 keine Effekte auf die Augenentwicklung. Sowohl auf der behandelten (Stern), wie auch auf der unbehandelten Seite bildet sich ein Augenbecher. C-D': Vergleicht man die behandelte Seite (D-D') mit der unbehandelten Seite (C-C'), so ist die MITF-Lokalisation unverändert. E-H': Durch die gleichzeitige Applikation von NOGGIN und WNT im Stadium HH9- (E) bleibt die Augenbecherbildung einen Tag nach der Operation (Stern) unterdrückt. G-G': Auf der unbehandelten Seite ist MITF auch einen Tag nach der Behandlung im Augenvesikel exprimiert. H-H': Die Inaktivierung der BMP-Signalkette durch NOGGIN führt trotz gleichzeitiger WNT-Applikation zum Ausbleiben der MITF-Lokalisation. Der Maßstabsbalken in H' entspricht 100 µm, in A 200 µm, in B 320 µm, in C-D 83 µm, in E 256 µm, in F 357 µm und in G-H 100 µm.

3.17. BMPs können auch in späteren Entwicklungsstadien RPE induzieren

Die bereits gezeigten Ergebnisse stellen da, dass BMPs von essenzieller Bedeutung während der Spezifizierung der RPE-Domäne sind. Weitere Untersuchungen in dieser Studie haben gezeigt, dass BMPs auch im späteren Stadium des Augenbechers zu HH14 ausreichend sind, um ektopisch RPE in den differenzierenden Bereichen der zentralen NR zu induzieren. In Folge der BMP-Behandlung löste sich die NR vom RPE und entwickelte interessanter Weise eine RPE-ähnliche Morphologie (Abb. 42: B, D-D'', Dreieck). Eine dünnere NR konnte bei neun von einundzwanzig Behandlungen festgestellt werden (Abb. 42: B, D-D'', Dreieck). Das unbehandelte Auge ließ im Stadium E4 nur an der Spitze der CM und in den zentralen Bereichen des RPEs eine deutliche MITF-Protein-Färbung erkennen (Abb. 42: A, C-C'', Stern). Im Vergleich zum unbehandelten Auge konnte im behandelten Auge eine besonders starke Lokalisation des MITF-Proteins im dünneren Bereich der zentralen NR nachgewiesen werden (Abb. 42: D-D'', Dreieck). Auch die weniger dünnen Bereiche der mit BMP5 behandelten NR weisen schwach MITF auf (Abb. 42: D'-D'', Pfeil).

3.18. Die Funktion von BMPs und WNTs in späteren Stadien der Augenentwicklung

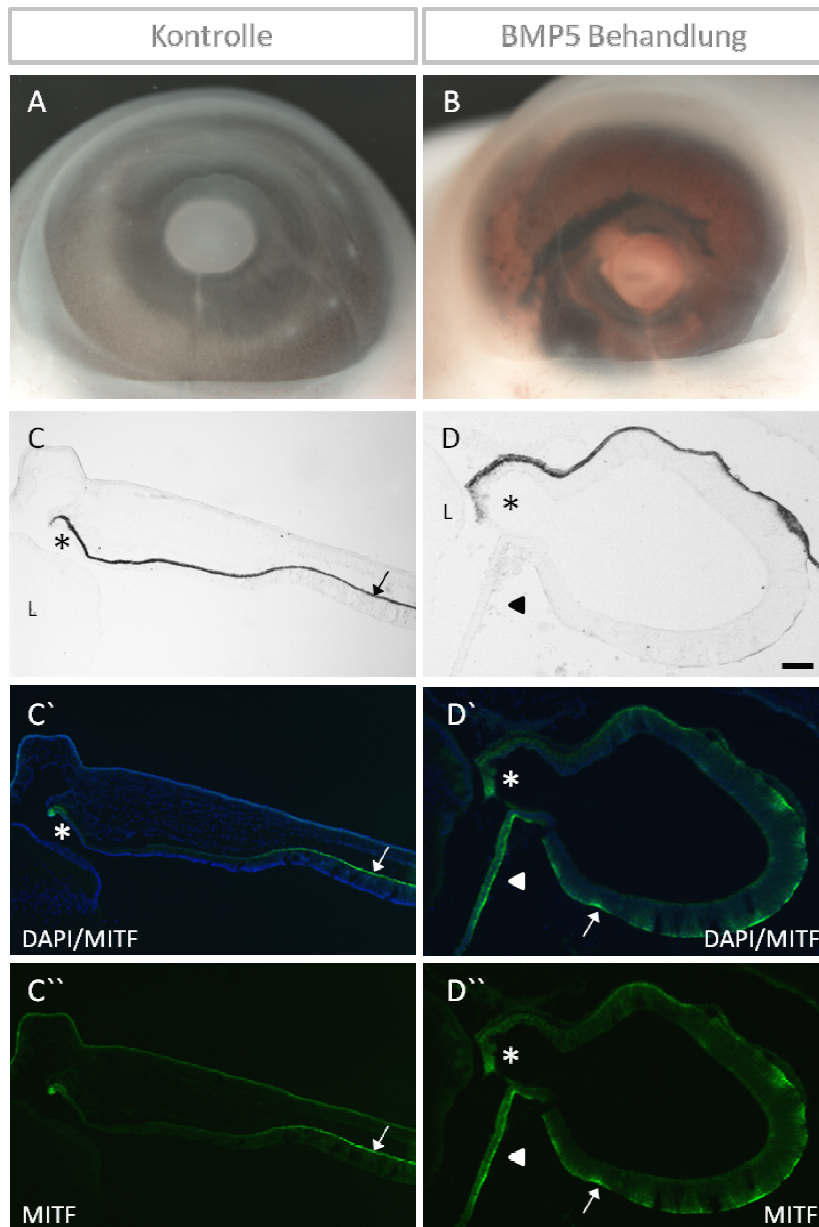


Abbildung 42: BMP-Signale reichen aus, um in späteren Stadien RPE in differenzierenden Zellen der zentralen NR zu induzieren.

Im Vergleich zum unbehandelten Auge (A) zeigt das gegen Stadium HH14 mit BMP5 behandelte Auge zu E8 eine starke Hyperpigmentierung. Periphere Pigmentierung im unbehandelten Auge (C) nahe der CM. Der Phänotyp des mit BMP5 behandelten Auges (B) zeigt nach erfolgter BMP5-Applikation in das Auge zum Zeitpunkt der Augenbecherbildung (HH14). Das mit BMP5 behandelte Auge (B) ist hyperpigmentiert (Dreieck) und deutlich kleiner als das unbehandelte Auge (A). C-D: Gefrierschnitt durch den Bereich an der CM. Nahe der Linsenregion (L) zeigt das behandelte Auge im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich stärkere Pigmentierung im Bereich der CM (Stern). Der Maßstabsbalken in D entspricht 100 µm, in A 1000 µm, in B 896 µm und in C 158 µm.

In Übereinstimmung mit der Theorie, dass sich *Vsx2* und *Mitf* gegenseitig antagonisieren (Müller, Rohrer et al. 2007), war der für die RPE-Spezifizierung charakteristische Marker MITF in den dünnen NR-Bereichen hoch- und der NR spezifische Marker *Vsx2* herunterreguliert (Abb. 43). Eine Ablösung der NR vom RPE konnte einen Tag nach der Behandlung mit BMP5 im Stadium HH25 in 87,5% aller Behandlungen dokumentiert (n=14/16) werden. Bei 75% der Operationen zeigte das mit BMP5 behandelte Auge eine deutlich dünnere zentralen NR (n=12/16, Abb. 43: B, Dreieck).

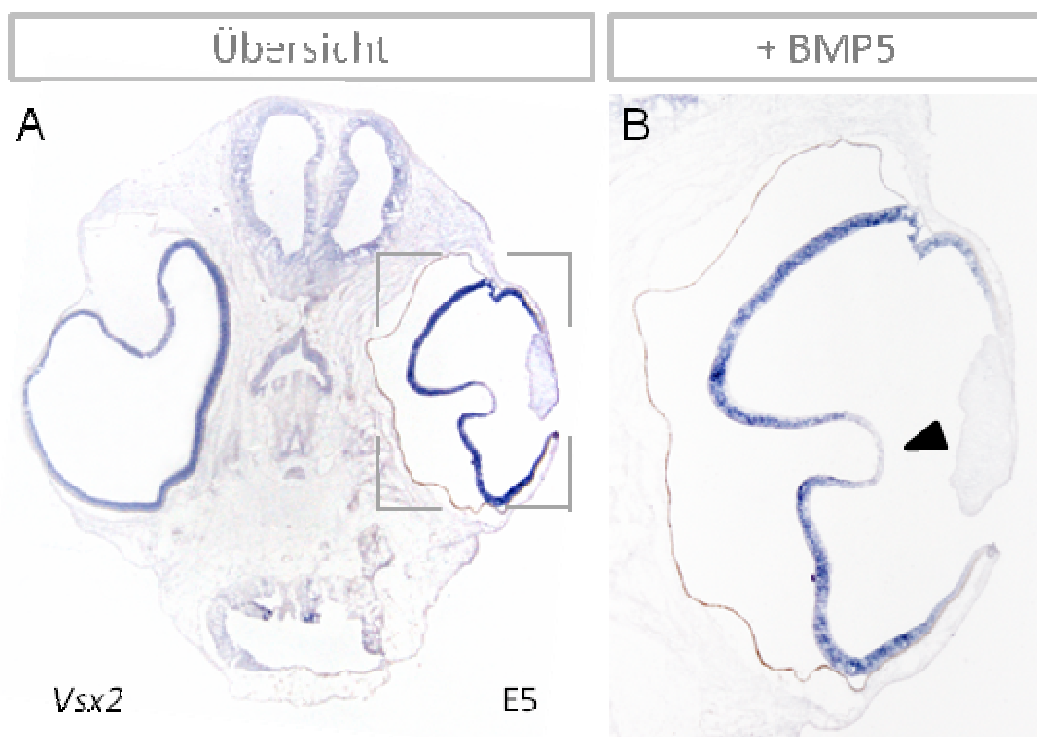


Abbildung 43: In frühen Augenbecherstadien führt BMP5 zur Ablösung der NR vom RPE, zur Verjüngung der NR und zum Verlust der *Vsx2*-Expression.

A: In Folge der BMP5-Applikation zu E4 zeigt das behandelte Auge (siehe Eingrenzung) zu E5 im Vergleich zur Kontrolle eine dünne NR, die sich vom RPE ablöst. Die Vergrößerung zeigt den Verlust der *Vsx2*-Expression im Bereich der verjüngten NR (Dreieck).

Parallelschnitte der bereits in Abbildung 42 dargestellten BMP5-Behandlung (Abb. 44: B-E') zeigen in der Vergrößerung (Ausschnitte des in A eingegrenzten Bereichs) eine deutliche Pigmentierung im dünnen Bereich der NR (Abb. 44: B). Besonders stark scheint das MITF-Protein in den pigmentierten Bereichen lokalisiert zu sein (Abb. 44: C, C'). Interessanterweise

scheinen die im Bereich der dünneren NR nachgewiesenen *Wnt2b*-Transkripte auf den pigmentierten Bereich der dünnen NR begrenzt zu sein (Abb. 44: D). Im Bereich der dünneren NR ist nur wenig oder überhaupt kein nukleäres β -Catenin nachweisbar (Abb. 44: E, E').

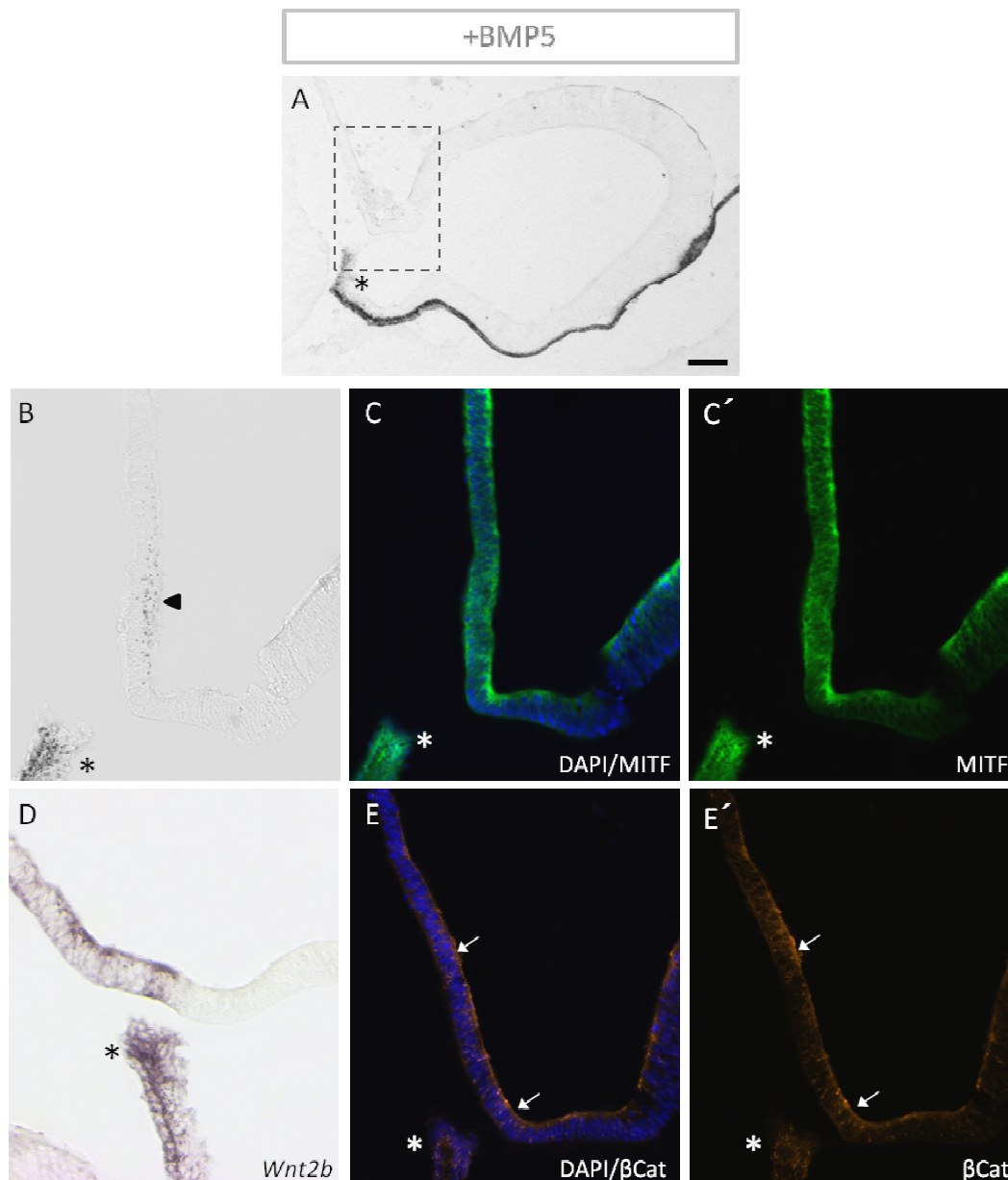


Abbildung 44: Im Vergleich zu β -Catenin scheint *Wnt2b* eine Funktion während der Respezifizierung der NR in Richtung RPE zu besitzen.

A: Übersicht über das mit BMP5 behandelte Auge zu E7. Die NR hat sich zum Teil vom RPE gelöst und befindet sich im Gefrierschnitt nahe der CM (Stern). B-E': Vergrößerung des in A eingegrenzten Bereiches. B: In den Bereichen der dünnen NR sind deutlich Pigmentgranula (Dreieck) zu erkennen. C-C': MITF ist im transdifferenzierenden NR- Gewebe stark exprimiert (grün). D-E': Parallelschnitte zu A. D: *Wnt2b*-Transkripte sind deutlich im transdifferenzierenden NR-Gewebe exprimiert (blau). Im Gewebe der dünnen NR kann nur

eine schwache β -Catenin-Lokalisation gezeigt werden (Pfeile). In den Zellkernen kann kein β -Catenin nachgewiesen werden. Der Maßstabsbalken in A entspricht 100 μm und in B-E` 33 μm .

Die CM des Huhns besteht aus einer äußeren pigmentierten und inneren unpigmentierten Schicht (Abb. 45: A, Pfeil). In der inneren Schicht befinden sich retinale Vorläuferzellen. Trotz der durchgehenden Pigmentierung (Abb. 45: A, Pfeil) kann eine MITF-Proteinfärbung nur im Bereich der pigmentierten CM-Spitze nachgewiesen werden (Abb. 45: B, B`, Pfeil). Diese Färbung scheint mit *Wnt2b*-Transkripten in der CM kolokalisiert zu sein (Abb. 45: C, Pfeil). In den retinalen Vorläuferzellen der CM konnte nukleäres β -Catenin festgestellt werden (Abb. 45: D, D`, Pfeil). Das auf das Neuroepithel der CM beschränkte nukleäre β -Catenin (Abb. 45: D, D`) konnte im Bereich der gesamten CM gezeigt werden (Dreieck). Die CM des operierten Auges zeigte vier Tage nach der Applikation von BMP5 eine deutliche Pigmentierung in der inneren Schicht (Abb. 45: E, Dreieck). Im Vergleich zum unbehandelten Auge schien die *Wnt2b*-Expression in den pigmentierten Bereichen schwach erhöht (Abb. 45: E-H`, Pfeil). In Folge der BMP5-Behandlung konnte MITF ektopisch in der gesamten CM vorgefunden werden (Abb. 45: F, F`, Pfeil). Im Gegensatz zur erhöhten MITF-Akkumulation schien die Akkumulation nukleären β -Catenins in der inneren Schicht der CM stark reduziert oder vollständig unterbunden zu sein (n=6/8, vergleiche D, D` mit H, H`).

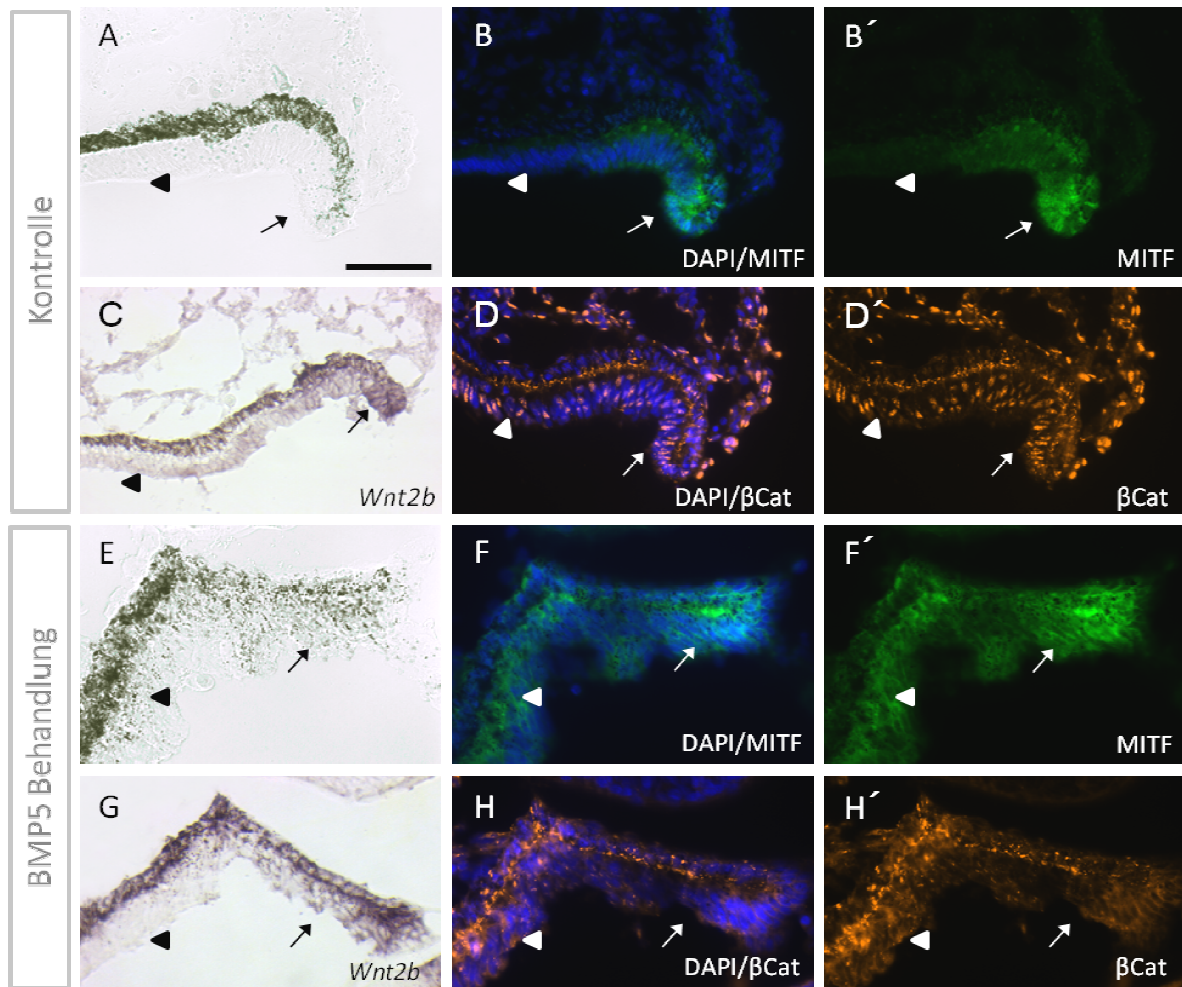


Abbildung 45: Die Behandlung des frühen Augenbechers mit BMP5 führt zur Hyperpigmentierung der CM.

A-D': Übersicht über den peripheren Bereich der CM (Kontrolle, E8). Die innere unpigmentierte Schicht (Dreieck) retinaler Vorläuferzellen lässt sich gut von der pigmentierten äußeren Schicht (Pfeil) der CM unterscheiden. Das MITF-Protein (B-B') ist in der Kontrolle auf den äußersten Bereich der CM begrenzt und scheint mit der in der Spitze der CM stärker werdenden *Wnt2b*-Expression (C) ko-lokalisiert. Nukleäres β -Catenin (D-D') ist in der CM nur in der unpigmentierten Schicht der retinalen Vorläuferzellen sichtbar. (E-H'). In Folge der BMP5-Behandlung weist die innere Schicht der CM eine deutliche Pigmentierung auf. Im Vergleich zur Kontrolle (F, F') kann in der gesamten pigmentierten CM eine starke Färbung des MITF-Proteins gezeigt werden. Auch außerhalb der *Wnt2b*-Expression kann eine Akkumulation des MITF-Proteins nachgewiesen werden. H-H': Nach der Operation kann in den retinalen Vorläuferzellen kein nukleäres β -Catenin mehr festgestellt werden. Der Maßstabsbalken in D entspricht 100 μ m, in A 1000 μ m, in B 896 μ m und in C 158 μ m.

Interessanterweise, führt die BMP5-Behandlung zu (HH14) in einigen Fällen (n=7/10) zur Verdickung des RPEs (Abb. 46). In der verdickten Region des RPEs kommt es zum Verlust der Pigmentierung (Abb. 46: A') und zu einer Herunterregulierung der *Mmp115*-Expression (Abb. 46: A). Der NR spezifische Marker *Vsx2* ist hingegen deutlich in den Bereichen des sich verdickenden RPEs exprimiert (Abb. 46: B).

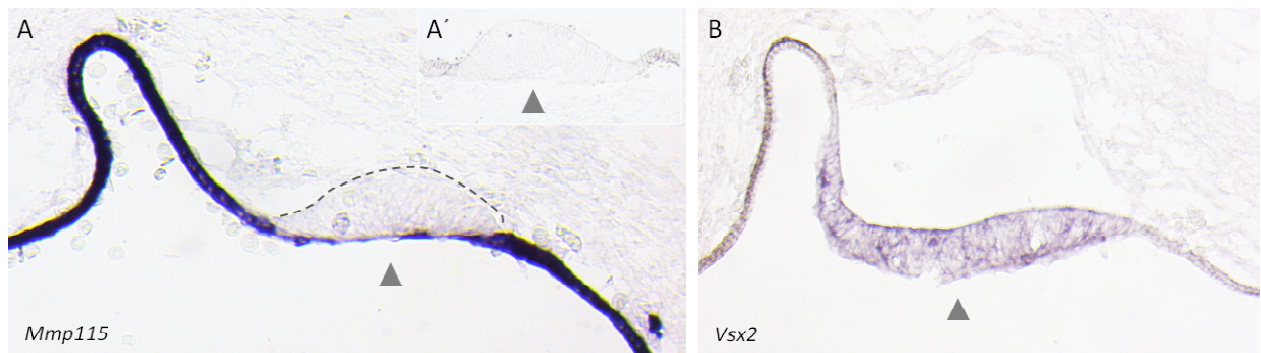


Abbildung 46: In frühen Augenbecherstadien führt BMP5 zur Ablösung der NR vom RPE, und zur Transdifferenzierung des RPEs in NR.

A-B: Das BMP5 behandelte Auge zeigt 24 Stunden nach der Operation eine verdickte unpigmentierte Region im zentralen RPE des Augenbechers (Dreieck). Im Vergleich zum angrenzenden RPE (Stern) können innerhalb der Verdickung keine Pigmentgranula gezeigt werden (Dreieck, (A')). Die spezifische *Mmp115*-Expression ist in diesem Bereich herunterreguliert (gestrichelte Linie). B: Im Gegensatz zu *Mmp115* ist der NR spezifische Marker *Vsx2* in diesem Bereich hochreguliert (Dreieck).

Um die Funktion des WNT-Signaleweges während der RPE-Differenzierung im Augenbecherstadium (HH14) zu untersuchen, wurde das WNT3a-Protein im Stadium (HH14) appliziert (Abb. 47: A). Ein Tag nach der Behandlung, konnte im Bereich der CM eine starke Hyperpigmentierung (Vergleiche Abb. 47: B und C, C') und eine erhöhte MITF-Lokalisation nachgewiesen (Vergleiche Abb. 47: E-F' und G-H') werden.

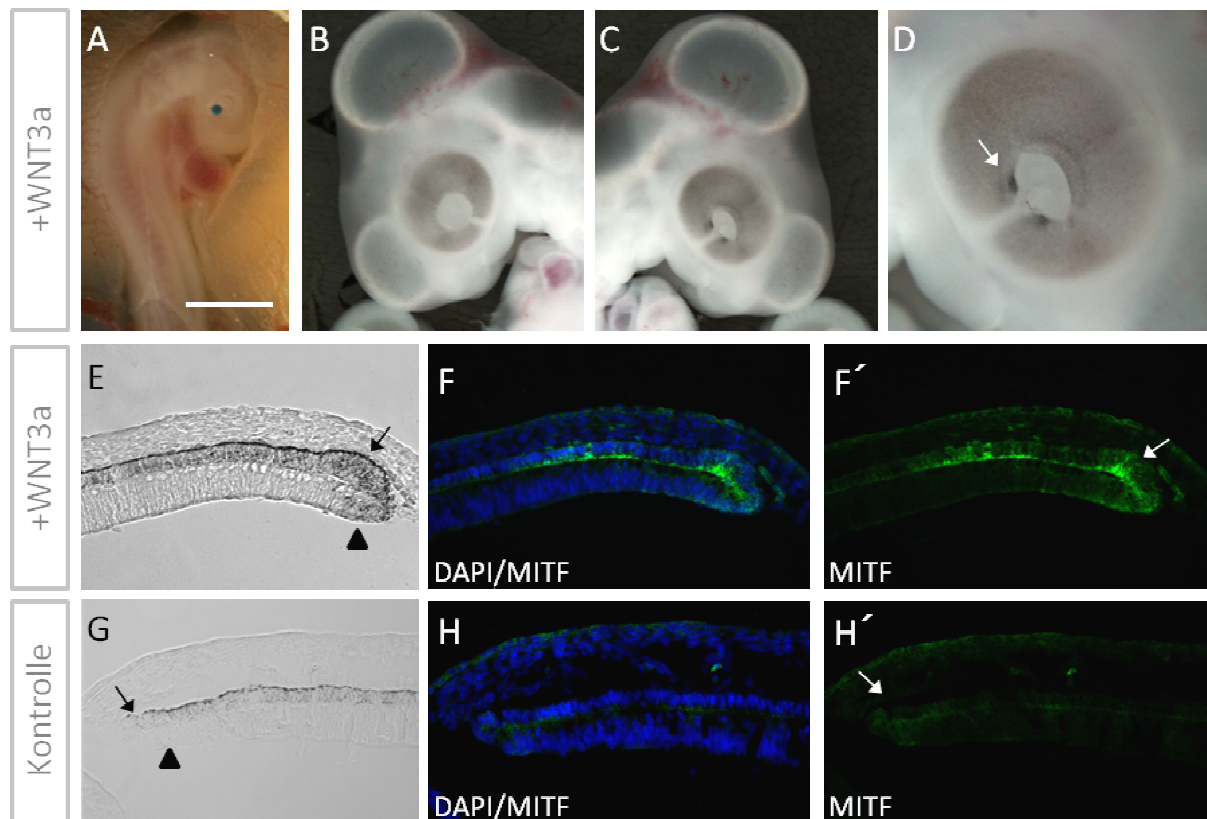


Abbildung 47: Die späte Applikation von WNT3a führt zur Hyperpigmentierung im Bereich der CM.

A: WNT3a Behandlung gegen Stadium HH14. B-D: Phänotyp nach WNT3a Behandlung gegen HH25 (B: unbehandelte Seite, C: behandelte Seite, D: Vergrößerung aus C). D: Die CM des behandelten Augenbechers ist stark hyperpigmentiert (Pfeil). E-H': Im Vergleich zur Kontrolle (G-H') zeigt das behandelte Auge (E-F') eine starke Hyperpigmentierung (Dreieck) im Bereich der retinalen Vorläuferzellen und im Bereich des RPEs. Der Maßstabsbalken in A entspricht 2000 μm , in B 80 μm , in D 34 μm und in E-H' 4 μm .

4. Diskussion:

Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit war es, *in vivo* die zellulären und molekularen Signale zu identifizieren, die für die Spezifizierung des RPE während der Hühnchen-Augenentwicklung *in vivo* verantwortlich sind. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden,

- dass Signale aus dem Oberflächenektoderm und nicht etwa Signale aus dem Mesenchym, wie zuvor angenommen, an der initialen Spezifizierung des RPEs beteiligt sind;
- dass sowohl BMPs, als auch WNTs aus dem Oberflächenektoderm essenziell für die Induktion der *Mitf*-Expression und somit für die RPE-Entwicklung sind;
- dass der WNT/GSK-3 β und nicht der kanonische WNT/ β -Catenin Signalweg für die RPE-Spezifizierung verantwortlich ist;
- dass BMPs das Zellschicksal bereits spezifizierter retinaler Vorläuferzellen des Augenbechers noch ändern und RPE Gewebe induzieren können.

Weiterhin konnte ich zeigen,

- dass das Oberflächenektoderm für die Augenbecherbildung essenziell ist.
- dass BMPs oder WNTs das Oberflächenektoderm ersetzen können und zu einer Augenbecherbildung führen.

4.1. Das Oberflächenektoderm induziert die RPE-Entwicklung im Huhn

Obwohl die äußere und innere Zellschicht des Augenbechers von den gleichen Vorläuferzellen des Neuroepithels abstammen, entwickeln sie sich zu zwei ganz unterschiedlichen Gewebetypen mit unterschiedlichen Funktionen: aus dem äußeren Epithel des Augenbechers entsteht das einschichtige, cuboidale RPE und aus dem inneren Epithel des Augenbechers die mehrschichtige, neuronale Retina (NR). Frühe *in vivo* und *in vitro* Studien führten zum klassischen proximo-distalen Modell der Augenentwicklung [Abb. 1,

siehe Einleitung] (Martinez-Morales, Rodrigo et al. 2004; Adler and Canto-Soler 2007; Fuhrmann 2008). Dabei schienen Signale aus dem distal gelegenen Oberflächenektoderm die Netzhautentwicklung zu induzieren, während Signale aus dem proximal gelegenen okularen Mesenchym die RPE-Entwicklung förderten. Werden zum Beispiel Explantate von isolierten Augenvesikeln mit okularem Mesenchym umgeben, entwickelt sich anstelle der NR nur RPE (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Im Gegensatz dazu scheint in der Maus und im Huhn in Abwesenheit des Oberflächenektoderms nur die Entwicklung der NR, nicht aber des RPEs beeinträchtigt zu sein, da sich nur ein verkrümmter, pigmentierter Vesikel entwickelt (Mikami et al., 1939; Hyer, Mima et al. 1998; Nguyen and Arnheiter 2000). Expressionsstudien im Hühnchen zeigen jedoch, dass die *Mitf*-Expression bereits zu einem früheren Zeitpunkt induziert ist (Müller, Rohrer et al. 2007) und nicht erst in Zellen des sich differenzierenden, proximalen RPEs (Mochii, Mazaki et al. 1998). Auch in der Maus ist die *Mitf*-Expression anfänglich im ganzen Bereich des Augenvesikels zu finden (Nguyen and Arnheiter 2000). Somit war zum Zeitpunkt als das Ektoderm in den oben beschriebenen Versuchen entfernt wurde, das RPE bereits determiniert. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass das Entfernen des OE zu einem früheren Zeitpunkt, also noch bevor eine *Mitf*-Expression im frühen Augenvesikel beobachtet werden kann, einen Einfluss auf die RPE-Spezifizierung hat. In Abwesenheit des Oberflächenektoderms (HH9/10) konnte kein MITF-Protein im Augenvesikel detektiert werden (Abb. 20). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Transplantationsexperimente, bei denen das Oberflächenektoderm des Augenvesikels zurück in das Hühnchen transplantiert wurde. Das Fehlen des Oberflächenektoderms führte zum vollständigen Verlust der Pigmentierung (I. Steinfeld; Steinfeld et al., 2013). Somit sind Signale aus dem Oberflächenektoderm und nicht aus dem Mesenchym für die RPE-Spezifizierung verantwortlich.

4.2. BMPs aus dem Oberflächenektoderm sind essenziell für die RPE Entwicklung

Ein potentieller Kandidat, der bei der Spezifizierung des RPE involviert sein könnte, ist Aktivin, ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie. Kokulturen von Explantaten der Augenvesikel mit okularem Mesenchym differenzieren ausschließlich in RPE, und dieser Effekt kann durch

die Zugabe von Aktivin simuliert werden (Fuhrmann, Levine et al. 2000). Bisher konnte Aktivin nur im okularen Mesenchym von Frosch und Maus, nicht aber im Hühnchen nachgewiesen werden (Dohrmann, Hemmati-Brivanlou et al. 1993; Feijen, Goumans et al. 1994; Fuhrmann, Levine et al. 2000). BMPs werden ebenfalls im präsumptiven RPE, im okularen Mesenchym und Oberflächenektoderm exprimiert (Furuta, Piston et al. 1997; Vogel-Höpker, Momose et al. 2000; Müller, Rohrer et al. 2007). Obwohl BMP5 und BMP7 jedoch nicht in der Lage sind, den oben beschriebenen Effekt von Aktivin *in vitro* zu simulieren und präsumptive NR in RPE umzuwandeln (Fuhrmann, Levine et al. 2000), weisen die erzielten Ergebnisse in dieser Arbeit auf eine essenzielle Funktion der BMPs während der RPE-Spezifizierung hin. Zum einen deutet die Anreicherung von pSMAD in den Zellkernen des distalen Augenvesikels darauf hin, dass der BMP-Signalweg zum Zeitpunkt der RPE-Spezifizierung aktiviert ist und zum Anderen kann BMP7 die Funktion des Oberflächenektoderms ersetzen und MITF aufrecht erhalten (Abb. 21, 22). „Loss-of-function“ Studien, bei denen der BMP-Signalweg blockiert wurde, bestätigen diese Beobachtungen. Die Implantierung von NOGGIN-getränkten „beads“ zum Zeitpunkt der RPE-Spezifizierung führt zu einem Verlust von MITF im Augenvesikel (N. Coronato; siehe auch Abb. 41).

4.3 Der WNT-Signalweg spielt ebenfalls eine Rolle bei der RPE Spezifizierung

Anfänglich (HH9/10) wird die *Mitf*-Expression im gesamten distalen Bereich des Augenvesikels beobachtet, während kurze Zeit später MITF und pSMAD auf den dorsalen Bereich des Augenvesikels lokalisiert sind (Abb. 17, 18). Die Beobachtung, dass *Bmps* zu diesem Zeitpunkt jedoch noch im gesamten Oberflächenektoderm exprimiert werden (Furuta, Piston et al. 1997; Müller, Rohrer et al. 2007), lässt vermuten, dass weitere Signale bei der Stabilisierung der RPE-Domäne auf den dorsalen Augenvesikel beteiligt sind. Arbeiten von Masasuke Araki und seinen Mitarbeitern (Nara, Japan) deuteten darauf hin, dass eine dorso-ventrale Polarität im frühen Augenvesikel im Hühnchen existiert (Layer et al. 2010). Zu diesem Zeitpunkt sind die dorsalen Zellen des Augenvesikels bereits determiniert, sich in Zellen des RPEs zu entwickeln, während ventrale Zellen sich zur Netzhaut zu entwickeln scheinen (Uemonsa, Sakagami et al. 2002; Kagiya, Gotouda et al. 2005; Hirashima,

Kobayashi et al. 2008; Kobayashi, Yasuda et al. 2009; Kobayashi, Yasuda et al. 2010). Während der frühen Embryonalentwicklung der Vertebraten werden *Bmps* und *Wnts* häufig in dorsalem Gewebe koexprimiert und sind für die dorsale Musterbildung vieler Organe verantwortlich (Abu-Khalil, Fu et al. 2004). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass *Wnt2b* sowohl im dorsalen Ektoderm als auch im dorsalen Augenvesikel zum Zeitpunkt der RPE-Spezifizierung im Hühnchen exprimiert wird (Abb. 23). Die Applikation von WNT3a, oder auch die Hemmung der GSK3- β in den Augenvesikeln führte dazu, dass die Netzhautentwicklung komplett inhibiert wurde und die neuroepithelialen Zellen des gesamten Augenvesikels, einschließlich des Augenstils, sich in RPE entwickeln (Abb. 33, 34). Die von mir durchgeführten Funktionsverlust-Studien weisen darauf hin, dass mehrere WNT-Signale für die RPE-Entwicklung verantwortlich zu sein scheinen. Zum Einen hatte die Hemmung von *Wnt2b* durch die Elektroporation von si*Wnt2b* während der frühen Augenvesikelstadien keine Effekte (Abb. 32) und bestätigt somit die Beobachtung, dass in *Wnt2b*-KO-Mäusen die Augenentwicklung nicht beeinträchtigt ist. Zum Anderen hatte aber die Hemmung mehrerer WNT-Liganden mit Hilfe der Implantierung von WIF-„beads“ einen Verlust von MITF zur Folge (Abb. 30).

4.4. Ein nicht-kanonischer WNT-Signalweg scheint bei der RPE-Spezifizierung im Hühnchen eine Rolle zu spielen

Abhängig von ihrem Kontext werden WNT-Signale über den kanonischen oder den nicht-kanonischen WNT-Signalweg übermittelt (Katoh 2007; Kikuchi, Yamamoto et al. 2007). In letzter Zeit wurde für immer mehr WNT-Liganden gezeigt, dass sie Bestandteil der kanonischen wie auch nicht-kanonischen Signalkette sind (Kikuchi, Yamamoto et al. 2007). Während der frühen Augenentwicklung wird *Wnt2b* im Augenumfeld exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte ich nur eine Ansammlung von β -Catenin in den Zellkernen des Oberflächenektoderms, nicht jedoch in den Zellkernen des distalen Neuroepithels im Augenvesikels feststellen (Abb. 24). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass während der frühen Augenvesikelstadien im Huhn ein nicht-kanonischer Signalweg bei der Spezifizierung des RPEs involviert ist. Auch konnte in Folge der Applikation von WNT3a oder der Hemmung

der GSK3- β -Kinase, die zur Bildung von RPE im gesamten Augenvesikel führen, keine Ansammlung von β -Catenin beobachtet werden (Abb. 38). Weiterhin konnte ich zeigen, dass im Gegensatz zur Hemmung der WNT-Liganden die spezifische Hemmung des kanonischen WNT-Signalwegs (LRP5/6 Rezeptoren; siehe Einleitung) keinen Einfluss auf die MITF-Expression und Pigmentierung hat (Abb. 31). Diese Beobachtungen bestätigen ebenfalls die Beobachtungen in verschiedenen Maus-Mutanten. In β -catenin bzw. Lrp5/6 Mutanten kommt es weiterhin zur Induktion der *Mitf*-Expression (Fujino, Asaba et al. 2003; Zhou, Molotkov et al. 2008), und erst zu einem späteren Zeitpunkt kommt es zu einem Verlust der Pigmentierung (Hagglund, Berghard et al. 2013). Zusammenfassend kann man sagen, dass während der RPE-Spezifizierung ein nicht-kanonischer WNT-Signalweg bei der Regulation der *Mitf*-Expression eine Rolle spielt.

4.5. Der WNT- und der BMP-Signalweg kooperieren bei der RPE-Spezifizierung im Huhn

Die BMP-induzierte Entwicklung von RPE-Vorläuferzellen scheint durch einen neuen WNT/ β -Catenin-unabhängigen Signalweg gesteuert zu werden (Fuentealba, Eivers et al. 2007; Eivers, Fuentealba et al. 2008). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass eine Wechselwirkung zwischen den BMP- und WNT-Signalwegen für die RPE-Spezifizierung im dorsalen Bereich des Augenvesikels verantwortlich ist. Während die Implantation von BMP- oder WNT/AP-„beads“ in den Augenvesikel dazu führte, dass RPE in den prospektiven Zellen der NR bzw. dem optischen Stiel induziert wurden (Abb. 33-35), konnte ich diesen Effekt nicht beobachten, wenn gleichzeitig der BMP- und WNT-Signalweg inhibiert wurde. Dass ein Zusammenspiel des BMP- und WNT-Signalweges zur Induktion der *Mitf*-Expression führt, wurde kürzlich in einer *in vitro* Studie bestätigt (Pandit, Jidigam et al. 2015). Während niedrige Konzentrationen von BMP oder WNT3a nicht ausreichten, die *Mitf*-Expression in kultivierten Augenvesikeln von Hühnern zu induzieren, waren diese Konzentrationen ausreichend, wenn BMP und WNT3a zusammen in die Kulturschale gegeben wurden.

Weiterhin konnte ich beobachten, dass eine Aktivierung des BMP-Signalweges bei gleichzeitiger GSK3- β -Hemmung (Implantieren eines AP-„beads“) nicht zu einer Anhäufung

von β -Catenin im Zellkern führte (Abb. 38). Positionsinformationen durch dorso-ventrale und antero-posteriore Gradienten von Wachstumsfaktoren im Embryo, wie z.B. WNTs und BMPs, können auf der Ebene von SMAD1/5/8 integriert werden (Eivers, Fuentealba et al. 2008). SMAD1 besitzt spezifische Phosphorylierungsmöglichkeiten, so dass eine Wechselwirkung zwischen den BMP/BMP-Rezeptor, dem FGF/MAPK-, und dem WNT/GSK3- β -Signalwegen möglich ist (Fuentealba, Eivers et al. 2007) [siehe Einleitung S. 26]. Tatsächlich scheint der Phosphorylierungsstatus von SMAD1 zu bestimmen, ob die Zellen des Augenvesikels sich entlang eines retinalen oder epithelialen Zellschicksals entwickeln (Abb. 48). Dabei scheint das *Wnt*-exprimierende dorsale Oberflächenektoderm die BMP-Wirkung im dorsalen Augenvesikel durch die Hemmung der GSK3- β -Kinase zu stabilisieren, so dass diese Zellen weiterhin MITF exprimieren und sich somit zum RPE entwickeln (Abb. 48). In Abwesenheit von *Wnts* im ventralen Augenbereich kam es dagegen nicht zur Hemmung der GSK3- β -Kinase, wodurch es zu einer Mehrfachphosphorylierung des Transkriptionsfaktors SMAD1 und somit zur Degradierung kam. Als Folge scheint sich im ventralen Bereich der Augenanlage die Netzhaut zu entwickeln (Steinfeld, Steinfeld et al. 2013). Diese Hypothese konnte durch folgende Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe aufgestellt werden. Nach der Entfernung des Oberflächenektoderms konnte eine Überexpression von Konstitutiv-aktivem *pSmad* (*CA-Smad*) die MITF-Akkumulation im Augenvesikel aufrechterhalten (N. Coronato; Steinfeld et al. 2013). Im Gegensatz dazu führte die Hemmung des proteosomalen Abbaus von pSMAD im Augenvesikel zu einer ektopischen Expression im Bereich der prospektiven NR und zu einem gleichzeitigen Verlust der Expression des retinalen Vorläufers *Vsx2* (M. Hampel; Steinfeld et al., 2013). Zusammenfassend konnte durch unsere Arbeiten gezeigt werden, dass die frühe Augenanlage in Wirbeltieren zuerst in eine dorsale RPE- und eine ventrale Netzhaut-Domäne gegliedert wird, und die Netzhaut sich erst kurze Zeit später distal entwickelt, während es im proximalen Bereich zur Differenzierung des RPEs kommt.

Ein ähnliches Zusammenspiel des BMP- und WNT-Signalweges auf der Stufe von pSMAD scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Wanderung von prospektiven Herzzellvorläuferzellen im Huhn zu spielen (Song, McColl et al. 2014).

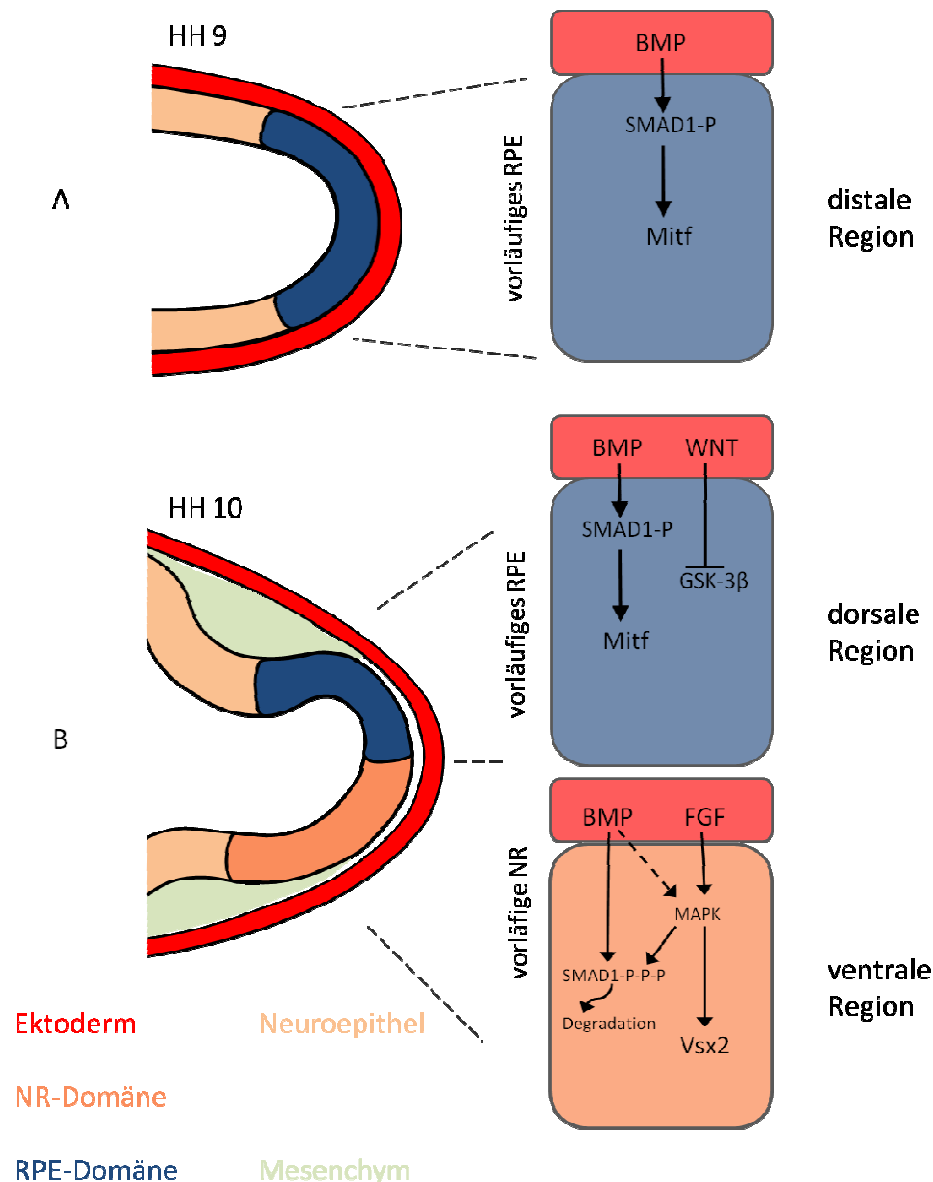


Abbildung 48: Modell der dorsoventralen Musterbildung des Augenesikels unter Einbeziehung der sich auf Stufe der SMAD-Phosphorylierung überschneidenden BMP-, WNT- und FGF- Signalwege

Das Modell zeigt, (A) dass BMPs die aus dem Oberflächenektoderm freigesetzt werden, die anfängliche RPE-Spezifizierung durch die Phosphorylierung von SMAD1, 5 oder 8 initiieren und somit zur *Mitf*-Expression in den Zellen des distalen optischen Vesikels im Stadium HH9 (Müller, Rohrer et al. 2007) führen. Im Stadium HH10 führt das WNT-Signal aus dem dorsalen Oberflächenektoderm zur Hemmung der GSK3- β , was wiederum dazu führt, dass das BMP-Signal stabilisiert wird. Der Transkriptionsfaktor pSMAD kann sich dadurch in den Zellkern verlagern und im dorsalen Augenesikel eine MITF-Lokalisation bewirken. Die Zellen des dorsalen Augenesikels werden dadurch in Richtung eines epithelialen Zellschicksals dirigiert. Eine mögliche Erklärung für die Spezifizierung der NR-Domäne im ventralen Bereich des Augenesikels könnte in der dreifachen Phosphorylierung der SMAD-Proteine durch BMPs und die im ventralen Bereich durch FGFs aktivierte MAPK liegen. Dreifach phosphorylierte SMADs werden proteasomal abgebaut. Gemeinsam mit den im ventralen Bereich exprimierten FGFs könnte der proteasomale Abbau der pSMAD-Proteine zur Induktion von *Vsx2* dem spezifischen NR-Marker führen.

4.6. Während späterer Entwicklungsstadien führt die BMP-Applikation zur Bildung von ektopischem RPE und NR Gewebe

In einigen Spezies kann das RPE durch Einwirkung von Wachstumsfaktoren in Netzhaut transdifferenziert werden. Im Gegensatz dazu wurde bisher die ektopische Entwicklung von RPE-Gewebe *in vivo* beobachtet. Wie bereits oben beschrieben, sind BMPs aus dem Oberflächenektoderm für die RPE-Entwicklung multipotenter Zellen des Augenvesikels verantwortlich. In anschließenden Untersuchungen konnte ich nun erstmals nachweisen, dass BMPs auch die Bildung von ektopischem RPE-Gewebe in bereits spezifizierten Netzhautzellen stimulieren kann (Abb. 42). Das induzierte Gewebe hat eine RPE-ähnliche Morphologie, ist pigmentiert, und exprimiert regulatorische Gene des RPE, wie z.B. *Mitf*, *Wnt2b*, sowie die Differenzierungsgene *Mmp115* und *Rpe65*.

Weiterhin konnte ich Effekte von BMP auf das RPE selbst beobachten. Dabei führte die BMP-Behandlung zu einer Erhöhung der RPE-spezifischen Genexpression, sowie einer Hyperpigmentierung im RPE (Abb. 42).

4.7. Fazit

Die Koordination der Genexpression während der Embryonalentwicklung in Wirbeltieren führt zur korrekten Entwicklung der Organe. Meine Ergebnisse haben neue Erkenntnisse darüber erbracht, wie Zellen während der Augenentwicklung miteinander kommunizieren, um unterschiedliche Zelltypen im Auge zu bilden. Weiterhin konnte ich wichtige Signale identifizieren, welche die Zellen des Augenvesikels instruieren, RPE zu bilden. Die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Ergebnisse könnten zur Entwicklung von effizienteren, standardisierten Protokollen zur Gewinnung von RPE im Zusammenhang mit Zellersatztherapien beitragen (Eiraku, Takata et al. 2011; Morris, Forbes-Osborne et al. 2011; Colozza, Locker et al. 2012; Cramer and MacLaren 2013; Sasai 2013; Gjorevski, Ranga et al. 2014; Reynolds and Lamba 2014), oder zu neuen therapeutischen Methoden führen, die Krankheitsprozesse des RPEs verzögern bzw. verhindern.

Literatur

- Abdul-Ghani, M., D. Dufort, et al. (2011). "Wnt11 promotes cardiomyocyte development by caspase-mediated suppression of canonical Wnt signals." *Mol Cell Biol* 31(1): 163-178.
- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J* 16(13): 3797-3804.
- Abu-Khalil, A., L. Fu, et al. (2004). "Wnt genes define distinct boundaries in the developing human brain: implications for human forebrain patterning." *J Comp Neurol* 474(2): 276-288.
- Adler, R. and M. V. Canto-Soler (2007). "Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies." *Dev Biol* 305(1): 1-13.
- Baker, M. (2013). "Neuroscience: Through the eyes of a mouse." *Nature* 502(7470): 156-158.
- Beenken, A. and M. Mohammadi (2009). "The FGF family: biology, pathophysiology and therapy." *Nat Rev Drug Discov* 8(3): 235-253.
- Bernstein M.H. (1961). "Functional architecture of the retinal epithelium." The structure of the eye. Smelser G.K. (ed.). Academic Press. London pp: 139-150.
- Braekvelt, C. R. (1990). "Fine structure of the retinal pigment epithelium of the mallard duck (*Anas platyrhynchos*)." *Histol Histopathol* 5(2): 133-138.
- Broun, M., L. Gee, et al. (2005). "Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway." *Development* 132(12): 2907-2916.
- Brown, J. D., M. R. DiChiara, et al. (1999). "MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells." *J Biol Chem* 274(13): 8797-8805.
- Celeste, A. J., J. A. Iannazzi, et al. (1990). "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9843-9847.
- Chen, D., W. Xu, et al. (2003). "SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma." *Cancer Res* 63(20): 6626-6634.
- Cho, S. H. and C. L. Cepko (2006). "Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye." *Development* 133(16): 3167-3177.
- Chow, R. L. and R. A. Lang (2001). "Early eye development in vertebrates." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 255-296.
- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." *Cell* 149(6): 1192-1205.
- Cliffe, A., F. Hamada, et al. (2003). "A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling." *Curr Biol* 13(11): 960-966.
- Colozza, G., M. Locker, et al. (2012). "Shaping the eye from embryonic stem cells: Biological and medical implications." *World J Stem Cells* 4(8): 80-86.
- Congdon, N., B. O'Colmain, et al. (2004). "Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States." *Arch Ophthalmol* 122(4): 477-485.
- Cramer, A. O. and R. E. MacLaren (2013). "Translating induced pluripotent stem cells from bench to bedside: application to retinal diseases." *Curr Gene Ther* 13(2): 139-151.
- Crossley, P. H., S. Martinez, et al. (2001). "Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles." *Neuroscience* 108(2): 183-206.
- Davey, M. G. and C. Tickle (2007). "The chicken as a model for embryonic development." *Cytogenet Genome Res* 117(1-4): 231-239.
- Dawes, L. J., Y. Sugiyama, et al. (2013). "Wnt-frizzled signaling is part of an FGF-induced cascade that promotes lens fiber differentiation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(3): 1582-1590.
- de Jongh, R. and J. W. McAvoy (1993). "Spatio-temporal distribution of acidic and basic FGF indicates a role for FGF in rat lens morphogenesis." *Dev Dyn* 198(3): 190-202.

- Desire, L., M. W. Head, et al. (1998). "Suppression of fibroblast growth factor 2 expression by antisense oligonucleotides inhibits embryonic chick neural retina cell differentiation and survival in vivo." *Dev Dyn* 212(1): 63-74.
- Dohrmann, C. E., A. Hemmati-Brivanlou, et al. (1993). "Expression of activin mRNA during early development in *Xenopus laevis*." *Dev Biol* 157(2): 474-483.
- Dono, R., G. Texido, et al. (1998). "Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice." *EMBO J* 17(15): 4213-4225.
- Dorey, K. and E. Amaya (2010). "FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis." *Development* 137(22): 3731-3742.
- Eiraku, M., N. Takata, et al. (2011). "Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture." *Nature* 472(7341): 51-56.
- Eivers, E., L. C. Fuentealba, et al. (2008). "Integrating positional information at the level of Smad1/5/8." *Curr Opin Genet Dev* 18(4): 304-310.
- Esteve, P. and P. Bovolenta (2006). "Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens." *Curr Opin Neurobiol* 16(1): 13-19.
- Feijen, A., M. J. Goumans, et al. (1994). "Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins." *Development* 120(12): 3621-3637.
- Fokina, V. M. and E. I. Frolova (2006). "Expression patterns of Wnt genes during development of an anterior part of the chicken eye." *Dev Dyn* 235(2): 496-505.
- Friedman, D. S., B. J. O'Colmain, et al. (2004). "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States." *Arch Ophthalmol* 122(4): 564-572.
- Fuentealba, L. C., E. Eivers, et al. (2007). "Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal." *Cell* 131(5): 980-993.
- Fuhrmann, S. (2008). "Wnt signaling in eye organogenesis." *Organogenesis* 4(2): 60-67.
- Fuhrmann, S., E. M. Levine, et al. (2000). "Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick." *Development* 127(21): 4599-4609.
- Fuhrmann, S., C. Zou, et al. (2014). "Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis." *Exp Eye Res* 123: 141-150.
- Fujimura, N., M. M. Taketo, et al. (2009). "Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium." *Dev Biol* 334(1): 31-45.
- Fujino, T., H. Asaba, et al. (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 229-234.
- Furuta, Y., D. W. Piston, et al. (1997). "Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development." *Development* 124(11): 2203-2212.
- Garcia-Lopez, R., A. Pombero, et al. (2009). "Fate map of the chick embryo neural tube." *Dev Growth Differ* 51(3): 145-165.
- Geetha-Loganathan, P. (2010). "Ectodermal Wnt6 is an early negative regulator of limb chondrogenesis in the chick embryo." *(BMC) Developmental Biology* 10:32.
- Gessert, S. and M. Kuhl (2010). "The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development." *Circ Res* 107(2): 186-199.
- Gjorevski, N., A. Ranga, et al. (2014). "Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis." *Development* 141(9): 1794-1804.
- Grimm, C. and G. Willmann (2012). "Hypoxia in the eye: a two-sided coin." *High Alt Med Biol* 13(3): 169-175.
- Guder, C., I. Philipp, et al. (2006). "The Wnt code: cnidarians signal the way." *Oncogene* 25(57): 7450-7460.
- Gunhaga, L. (2011). "The lens: a classical model of embryonic induction providing new insights into cell determination in early development." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1568): 1193-1203.

- Hagglund, A. C., A. Berghard, et al. (2013). "Canonical Wnt/beta-catenin signalling is essential for optic cup formation." PLoS One 8(12): e81158.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." J Morphol 88(1): 49-92.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951." Dev Dyn 195(4): 231-272.
- Hassel, S., M. Yakymovych, et al. (2006). "Interaction and functional cooperation between the serine/threonine kinase bone morphogenetic protein type II receptor with the tyrosine kinase stem cell factor receptor." J Cell Physiol 206(2): 457-467.
- He, X. and J. D. Axelrod (2006). "A WNTer wonderland in Snowbird." Development 133(14): 2597-2603.
- Hebel, R. (1970). "[Morphology and function of the pigment epithelium of the dog. An electron microscope study]." Z Anat Entwicklungsgesch 130(2): 115-128.
- Hedgepeth, C. M., M. A. Deardorff, et al. (1999). "Regulation of glycogen synthase kinase 3beta and downstream Wnt signaling by axin." Mol Cell Biol 19(10): 7147-7157.
- Heldin, C. H., K. Miyazono, et al. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature 390(6659): 465-471.
- Helms, J., C. Thaller, et al. (1994). "Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud." Development 120(11): 3267-3274.
- Hirashima, M., T. Kobayashi, et al. (2008). "Anteroventrally localized activity in the optic vesicle plays a crucial role in the optic development." Dev Biol 317(2): 620-631.
- Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." Curr Opin Genet Dev 6(4): 432-438.
- Holtfreter, J. (1939). Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung. Arch. Exp. Zellforsch. 23, 169-209.
- Holzmann, K., T. Grunt, et al. (2012). "Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer." J Nucleic Acids 2012: 950508.
- Horsford, D. J., M. T. Nguyen, et al. (2005). "Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity." Development 132(1): 177-187.
- Hyer, J., J. Kuhlman, et al. (2003). "Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation." Dev Biol 259(2): 351-363.
- Hyer, J., T. Mima, et al. (1998). "FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain." Development 125(5): 869-877.
- Intarapat, S. and C. D. Stern (2013). "Chick stem cells: current progress and future prospects." Stem Cell Res 11(3): 1378-1392.
- Jasoni, C., A. Hendrickson, et al. (1999). "Analysis of chicken Wnt-13 expression demonstrates coincidence with cell division in the developing eye and is consistent with a role in induction." Dev Dyn 215(3): 215-224.
- Jin, E. J., L. W. Burrus, et al. (2002). "The expression patterns of Wnts and their antagonists during avian eye development." Mech Dev 116(1-2): 173-176.
- Kagiyama, Y., N. Gotouda, et al. (2005). "Extraocular dorsal signal affects the developmental fate of the optic vesicle and patterns the optic neuroepithelium." Dev Growth Differ 47(8): 523-536.
- Katoh, M. (2007). "WNT signaling pathway and stem cell signaling network." Clin Cancer Res 13(14): 4042-4045.
- Kawabata, M., H. Inoue, et al. (1998). "Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors." EMBO J 17(14): 4056-4065.
- Kawano, Y. and R. Kypta (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci 116(Pt 13): 2627-2634.

- Kharazi, A., M. L. Levy, et al. (2013). "Chicken embryonic brain: an in vivo model for verifying neural stem cell potency." *J Neurosurg* 119(2): 512-519.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, et al. (2007). "Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors." *Cell Signal* 19(4): 659-671.
- Kitamoto, J. and J. Hyer (2010). "The expression of Wnt2b in the optic cup lip requires a border between the pigmented and nonpigmented epithelium." *Mol Vis* 16: 2701-2717.
- Klaus, A. and W. Birchmeier (2008). "Wnt signalling and its impact on development and cancer." *Nat Rev Cancer* 8(5): 387-398.
- Kobayashi, T., K. Yasuda, et al. (2009). "Generation of a second eye by embryonic transplantation of the antero-ventral hemicephalon." *Dev Growth Differ* 51(8): 723-733.
- Kobayashi, T., K. Yasuda, et al. (2010). "Coordinated regulation of dorsal bone morphogenetic protein 4 and ventral Sonic hedgehog signaling specifies the dorso-ventral polarity in the optic vesicle and governs ocular morphogenesis through fibroblast growth factor 8 upregulation." *Dev Growth Differ* 52(4): 351-363.
- Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1997). "Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1." *Nature* 389(6651): 618-622.
- Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras." *Genes Dev* 13(7): 804-816.
- Kubo, F., M. Takeichi, et al. (2003). "Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone." *Development* 130(3): 587-598.
- Lang, G. (2008) *Histotechnik*, Springer.
- Layer, P.G., et al. (2010). "New concepts for reconstruction of retinal and pigment epithelial tissues. *Expert. Rev. Ophthalmol.* 5(4), 523-543.
- Le Douarin, N. (2005). "The Nogent Institute--50 years of embryology." *Int J Dev Biol* 49(2-3): 85-103.
- Lee, J. S., A. Ishimoto, et al. (1999). "Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway." *J Biol Chem* 274(30): 21464-21470.
- Lim, Y., G. Cho, et al. (2005). "Altered BMP signaling disrupts chick diencephalic development." *Mech Dev* 122(4): 603-620.
- Liu, H., O. Mohamed, et al. (2003). "Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina." *Dev Dyn* 227(3): 323-334.
- Liu, I. S., J. D. Chen, et al. (1994). "Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer." *Neuron* 13(2): 377-393.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Martinez-Morales, J. R., I. Rodrigo, et al. (2004). "Eye development: a view from the retina pigmented epithelium." *Bioessays* 26(7): 766-777.
- Mariotti, S.P. and Pascolini, D. (2012). „Visual Impairment and Blindness 2010“. *Journal of Ophthalmology* 96(5): 614-8.
- Massague, J. and F. Weis-Garcia (1996). "Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals." *Cancer Surv* 27: 41-64.
- McWhirter, J. R., M. Goulding, et al. (1997). "A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1." *Development* 124(17): 3221-3232.
- Mikami, Y. (1939). Reciprocal transformation of parts in the developing eye-vesicle, with special attention to the inductive influence of lens-ectoderm on the retinal differentiation. *Zool. Mag. (Japan)* 51, 253-256.

- Miller, D. L., S. Ortega, et al. (2000). "Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice." Mol Cell Biol 20(6): 2260-2268.
- Mochii, M., Y. Mazaki, et al. (1998). "Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell." Dev Biol 193(1): 47-62.
- Morris, A. C., M. A. Forbes-Osborne, et al. (2011). "Microarray analysis of XOPS-mCFP zebrafish retina identifies genes associated with rod photoreceptor degeneration and regeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci 52(5): 2255-2266.
- Moustakas, A., S. Souchelnytskyi, et al. (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." J Cell Sci 114(Pt 24): 4359-4369.
- Müller, F., H. Rohrer, et al. (2007). "Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo." Development 134(19): 3483-3493.
- Murali, D., S. Yoshikawa, et al. (2005). "Distinct developmental programs require different levels of Bmp signaling during mouse retinal development." Development 132(5): 913-923.
- Nakamura, H., T. Katahira, et al. (2004). "Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation." Mech Dev 121(9): 1137-1143.
- Neumann, E. and K. Rosenheck (1972). "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes." J Membr Biol 10(3): 279-290.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, et al. (1982). "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields." EMBO J 1(7): 841-845.
- Nguyen, M. and H. Arnheiter (2000). "Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF." Development 127(16): 3581-3591.
- Ogino, H. and K. Yasuda (2000). "Sequential activation of transcription factors in lens induction." Dev Growth Differ 42(5): 437-448.
- Ohta, K., G. Lupo, et al. (2004). "Tskushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin." Dev Cell 7(3): 347-358.
- Ortega, S., M. Ittmann, et al. (1998). "Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2." Proc Natl Acad Sci U S A 95(10): 5672-5677.
- Pandit, T., V. K. Jidigam, et al. (2015). "Neural retina identity is specified by lens-derived BMP signals." Development 142(10): 1850-1859.
- Patterson, G. I. and R. W. Padgett (2000). "TGF beta-related pathways. Roles in Caenorhabditis elegans development." Trends Genet 16(1): 27-33.
- Patthey, C., T. Edlund, et al. (2009). "Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate." Development 136(1): 73-83.
- Picker, A., C. Brennan, et al. (1999). "Requirement for the zebrafish mid-hindbrain boundary in midbrain polarisation, mapping and confinement of the retinotectal projection." Development 126(13): 2967-2978.
- Pittack, C., G. B. Grunwald, et al. (1997). "Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos." Development 124(4): 805-816.
- Qu, F., J. Wang, et al. (2013). "WNT3A modulates chondrogenesis via canonical and non-canonical Wnt pathways in MSCs." Front Biosci (Landmark Ed) 18: 493-503.
- Quinlan, R., M. Graf, et al. (2009). "Complex and dynamic patterns of Wnt pathway gene expression in the developing chick forebrain." Neural Dev 4: 35.
- Reynolds, J. and D. A. Lamba (2014). "Human embryonic stem cell applications for retinal degenerations." Exp Eye Res 123: 151-160.
- Rossi, E., F. Siwiec, et al. (2007). "Pattern of Wnt ligand expression during chick eye development." Braz J Med Biol Res 40(10): 1333-1338.
- Rowan, S., C. M. Chen, et al. (2004). "Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene Chx10." Development 131(20): 5139-5152.

- Saito, S., B. Tampe, et al. (2015). "Primary cilia modulate balance of canonical and non-canonical Wnt signaling responses in the injured kidney." Fibrogenesis Tissue Repair 8: 6.
- Sapkota, G., C. Alarcon, et al. (2007). "Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker." Mol Cell 25(3): 441-454.
- Sasai, Y. (2013). "Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture." Nature 493(7432): 318-326.
- Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell 113(6): 685-700.
- Song, J., J. McColl, et al. (2014). "Smad1 transcription factor integrates BMP2 and Wnt3a signals in migrating cardiac progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A 111(20): 7337-7342.
- Souchelnytskyi, S., P. ten Dijke, et al. (1996). "Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses." EMBO J 15(22): 6231-6240.
- Steinfeld, J., I. Steinfeld, et al. (2013). "RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling." Development 140(24): 4959-4969.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." Physiol Rev 85(3): 845-881.
- Tamai, K., X. Zeng, et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." Mol Cell 13(1): 149-156.
- Torres, M. A., J. A. Yang-Snyder, et al. (1996). "Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development." J Cell Biol 133(5): 1123-1137.
- Trousse, F., P. Esteve, et al. (2001). "Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye." J Neurosci 21(4): 1292-1301.
- Tsukiyama, T. and T. P. Yamaguchi (2012). "Mice lacking Wnt2b are viable and display a postnatal olfactory bulb phenotype." Neurosci Lett 512(1): 48-52.
- Uemonsa, T., K. Sakagami, et al. (2002). "Development of dorsal-ventral polarity in the optic vesicle and its presumptive role in eye morphogenesis as shown by embryonic transplantation and in ovo explant culturing." Dev Biol 248(2): 319-330.
- Van Raay, T. J. and M. L. Vetter (2004). "Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development." Dev Neurosci 26(5-6): 352-358.
- Veeman, M. T., J. D. Axelrod, et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." Dev Cell 5(3): 367-377.
- Vogel-Höpker, A., T. Momose, et al. (2000). "Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development." Mech Dev 94(1-2): 25-36.
- Whitcher, J. P., M. Srinivasan, et al. (2001). "Corneal blindness: a global perspective." Bull World Health Organ 79(3): 214-221.
- Weimer, B. R. (1927) „The use of Nile Blue Sulfate as a vital stain on *Hydra*“.
- Whitman, M. (1998). "Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily." Genes Dev 12(16): 2445-2462.
- Wicks, S. J., S. Lui, et al. (2000). "Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II." Mol Cell Biol 20(21): 8103-8111.
- Wilke, T. A., S. Gubbels, et al. (1997). "Expression of fibroblast growth factor receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3) in the developing head and face." Dev Dyn 210(1): 41-52.
- Wilson, S. I., A. Rydstrom, et al. (2001). "The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo." Nature 411(6835): 325-330.
- Wolenski, F. S., M. J. Layden, et al. (2013). "Characterizing the spatiotemporal expression of RNAs and proteins in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*." Nat Protoc 8(5): 900-915.
- Wozney, J. M. (1992). "The bone morphogenetic protein family and osteogenesis." Mol Reprod Dev 32(2): 160-167.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1990). "Growth factors influencing bone development." J Cell Sci Suppl 13: 149-156.

- Wrana, J. L., L. Attisano, et al. (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." Nature 370(6488): 341-347.
- Yakymovych, I., P. Ten Dijke, et al. (2001). "Regulation of Smad signaling by protein kinase C." FASEB J 15(3): 553-555.
- Yanagawa, S., F. van Leeuwen, et al. (1995). "The dishevelled protein is modified by wingless signaling in Drosophila." Genes Dev 9(9): 1087-1097.
- Yost, C., M. Torres, et al. (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3." Genes Dev 10(12): 1443-1454.
- Zeng, G., F. Awan, et al. (2007). "Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse." Hepatology 45(1): 195-204.
- Zeng, G. (2013) „Wnt`er in liver: Exxpression of Wnt and Frizzled Genes in Mouse“.
- Zhou, C. J., A. Molotkov, et al. (2008). "Ocular coloboma and dorsoventral neuroretinal patterning defects in Lrp6 mutant eyes." Dev Dyn 237(12): 3681-3689.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

.....